

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

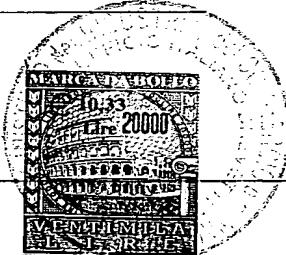
THIS PAGE BLANK (USPTO)



1700/373

#2

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHIREC'D 20 OCT 2000
WIPO PCT

4

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. RM99 A 000580

*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, il 23.01.2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"Residenza ROMA (ITALIA)codice 021337710022) Denominazione Residenza codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome de Benedetti Fabrizio ed altricod. fiscale denominazione studio di appartenenza SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.p.A.via Piazza di Pietran. 0039città

ROMA

cap 00186(prov) RMC. DOMICILIO ELETTIVO destinatario via n. città cap (prov) D. TITOLO "METODO PER L'ERADICAZIONE SELETTIVA DI CELLULE TUMORALI AVENTI LA FUNZIONE DI P53 INATTIVA".ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI NO SE ISTANZA: DATA N° PROTOCOLLO

INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) LTATO' Franco (Prof.)

cognome nome

3) GROSSI Milena (Dott.ssa)2) ZANETTI Antonio (Dr.)4)

F. PRIORITÀ nessuna

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOLGIMENTO RISERVE
1) <u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>
2) <u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>	<u></u>

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) <input type="checkbox"/> PROV	n. pag. <u>97</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)	SCIOLGIMENTO RISERVE
Doc. 2) <input type="checkbox"/> PROV	n. tav. <u>01</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)	<u></u>
Doc. 3) <input type="checkbox"/> RIS		lettera d'incarico, p ro babilit o e d'abbandono o cessione <input checked="" type="checkbox"/>	<u></u>
Doc. 4) <input type="checkbox"/> RIS		designazione inventore	<u></u>
Doc. 5) <input type="checkbox"/> RIS		documenti di priorità con traduzione in italiano	<u></u>
Doc. 6) <input type="checkbox"/> RIS		autorizzazione o atto di cessione	<u></u>
Doc. 7) <input type="checkbox"/> RIS		nominativo completo del richiedente	<u></u>

8) attestati di versamento, totale lire

novecentoquindicimilaAlessandro Stein **obbligatorio**

(f.s. Albo n. 831 B)

COMPILATO IL 21 09 1999

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Alessandro SteinCONTINUA SINO NOAlessandro SteinDEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO Sì.

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

R.M. 99 A 000580ROMA codice 58

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

Reg. A

L'anno millenovcento novantanove, il giorno ventuno, del mese di settembreIl (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopriportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE

L'Ufficiale Rogante

S. STEIN

R M 99 A 000580

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

“ METODO PER L'ERADICAZIONE SELETTIVA DI CELLULE TUMORALI AVENTI LA
FUNZIONE DI P53 INATTIVA ”

della Università degli Studi di Roma “La Sapienza”

con sede a ROMA (ITALIA)



DESCRIZIONE

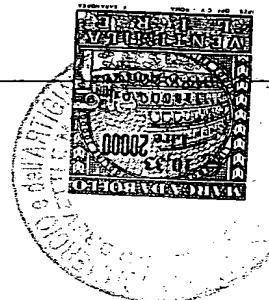
CAMPO DELLA INVENZIONE

La presente invenzione è relativa alla ricerca di composti utilizzabili nella terapia di forme tumorali che presentano la funzione p53 inattiva, con particolare riferimento alle forme tumorali a basso potenziale proliferativo.

STATO DELLA TECNICA

Obiettivo necessario di tutti gli approcci terapeutici diretti al trattamento delle varie forme di cancro è la completa eradicazione delle cellule tumorali originatesi nei tessuti del paziente costituiti per il resto da cellule sane. La efficacia del trattamento in tal senso risulta determinante al fine di evitare la formazione di forme recidivanti ed ottenere la completa guarigione del paziente.

Tale eradicazione viene attualmente perseguita dai tessuti dei pazienti sia tramite interventi diretti (rimozione chirurgica) che interventi indiretti (radioterapia e chemioterapia), spesso in combinazione tra di loro. In particolare, l'approccio chemioterapico, per la sua efficacia, è di fatto compreso nella maggior parte dei protocolli terapeutici correntemente utilizzati (da solo o in associazione a radioterapia o a trattamento chirurgico). La efficacia eradicativa di una buona parte dei composti chemioterapici



dipende dalla capacità caratteristica di uccidere in modo estremamente efficace ed altamente selettivo cellule in attiva fase proliferativa, la quale cosa li rende tra i composti maggiormente utilizzati nelle forme tumorali ad alto potenziale proliferativo.

Se però la caratteristica azione di questi composti consente di evitare la distruzione della maggior parte delle cellule normali del paziente (che non sono in proliferazione), non serve ad evitare la generale eradicazione di quella parte delle cellule normali che devono fisiologicamente essere capaci di proliferare.

Questa aspecificità di azione nei confronti delle cellule proliferanti si traduce sul piano clinico in una forte e generale tossicità a carico di tessuti quali il midollo osseo, le mucose gastrointestinali e la cute, normalmente riscontrata durante la somministrazione di tali farmaci.

Nonostante le notevoli potenzialità terapeutiche dei chemioterapici difficilmente si riesce ad ottenere la eradicazione completa delle cellule tumorali in soggetti malati, e ad evitare il conseguente ripresentarsi di forme recidivanti, dato che la interruzione del trattamento è spesso l'unica soluzione agli effetti collaterali conseguenti alla forte tossicità di questi farmaci, attualmente praticabile a livello clinico.

E' questa infatti la prassi normale ad esempio nel caso di tossicità a carico delle mucose gastrointestinali, mentre in caso di tossicità a carico dei precursori ematopoietici, talvolta in alternativa alla interruzione del trattamento si usa intervenire somministrando stimolatori della rinnovazione cellulare, quali ad esempio le interleuchine, oppure effettuando un trapianto di midollo. Tali interventi si sono rivelati nella prassi comunque non risolutivi

del problema in una significativa percentuale dei casi.(1)

Tali problemi legati alla tossicità, se limitano quindi l'utilizzo della maggior parte dei chemioterapici nelle forme ad alto potenziale proliferativo, ne impediscono di fatto l'utilizzazione nelle forme come il carcinoma del pancreas ~~ed alcuni tipi di linfomi che sono a basso potenziale proliferativo.~~

Infatti tali forme tumorali essendo caratterizzate da un potenziale proliferativo praticamente identico a quello dei tessuti replicanti normali richiederebbero tempi di trattamento e dosi di chemioterapico tali da uccidere aspecificamente la totalità delle cellule normali proliferanti.

In conseguenza sono stati sviluppati in arte una serie di approcci diretti alla protezione delle cellule normali proliferanti dall'azione tossica del chemioterapico. Tali approcci risultano per lo più basati sulla somministrazione, effettuata preventivamente a quella del chemioterapico, di composti capaci di inibire o comunque di rallentare la proliferazione delle cellule normali. L'azione di tali composti è comunque tale che un certo indebolimento della azione eradicativa del chemioterapico anche sulle cellule tumorali non può sempre essere esclusa. (2, 3, 4)

La principale difficoltà nell'ottenere la protezione delle cellule normali e la eradicazione delle tumorali in modo parimenti completo e selettivo risiede nella notevole somiglianza delle loro caratteristiche, tanto che, con riferimento all'azione del chemioterapico, esse sono pressoché indistinguibili. La individuazione di classi di composti capaci di instaurare uno "status differenziale", intendendosi per status differenziale una condizione per cui rispetto alla azione del chemioterapico le cellule normali mostrano una

sensibilità notevolmente ridotta, mentre le cellule tumorali la mantengano inalterata, si pone come una possibile prospettiva di soluzione.

Una condizione con caratteristiche vicine a quella descritta è costituita dalla condizione di binucleazione/multinucleazione che è noto determinarsi ~~rispettivamente nelle cellule normali e nella maggior parte delle cellule~~ tumorali in seguito alla somministrazione di composti tra i quali i più noti sono le citocalasine (5), ma anche composti quali le condramidi (8), le latrunculine (6) e le jasplakinolidi (7).

In particolare era noto che cellule normali trattate con le citocalasine registrano un blocco della citodieresi. In seguito a tale blocco, la cellula trattata con citocalasine alla fine della mitosi si dimostrava capace di riformare i nuclei "figli" ma non di dividersi, divenendo quindi binucleata. Tali cellule normali e binucleate non erano più capaci di entrare ulteriormente in fase S fintanto che erano mantenute in presenza di citocalasine. Le cellule trasformate, in particolare con oncogeni di virus a DNA (quali papova o adenovirus), si mostravano invece capaci di superare questo blocco, con sintesi di DNA nelle cellule binucleate e quindi dando luogo a figure cellulari multinucleate cioè con tre o più nuclei (9, 10, 11).

Non era però noto se tale effetto potesse essere instaurato anche su altri tipi di cellule tumorali altrimenti trasformate. Sul punto esistevano anzi informazioni contraddittorie ed in particolare secondo alcune fonti esso doveva considerarsi un effetto non registrabile in altri tipi di cellule tumorali come ad esempio, ma non solo, le cellule trasformate con singoli oncogeni retrovirali (12).



Per quanto poi riguardava il possibile uso combinato non era mai stato accertato se vi fosse una interferenza reciproca nell'azione di tali composti (citocalasine ed analoghi da un lato e chemioterapici dall'altro) considerati come classi funzionali. In tal senso, anzi, dati relativi ad una specifica citocalasina (la citocalasina B), in quanto riferivano di un pesante effetto inibitorio sui meccanismi di assunzione del chemioterapico delle cellule tumorali, deponevano nel senso della non utilizzabilità di tali composti per l'eradicazione completa delle cellule tumorali stesse (13, 14, 15, 16).

In aggiunta a ciò non era inoltre noto se l'effetto delle citocalasine (e degli altri composti funzionalmente analoghi) relativo alla determinazione di tale "status differenziale", potesse essere pienamente revertito nelle cellule normali in modo da consentire loro, in esito al trattamento con il chemioterapico, di recuperare la propria originaria capacità proliferativa in modo da ricostituire integralmente ed funzionalmente il tessuto.

La verifica della sussistenza o meno di tutte queste condizioni presentava inoltre una ulteriore serie di difficoltà. Il sistema modello ideale da utilizzare sarebbe stato ovviamente quello costituito dalle cellule che sono naturalmente bersaglio della chemioterapia e cioè le cellule umane staminali dei tessuti fisiologicamente proliferanti. Ciò non avrebbe però consentito di ricavare un risultato direttamente applicabile alla situazione *in vivo* dato che tali cellule se trasportate *in vitro* modificano il loro stato proliferativo così da risultare difficilmente utilizzabili (praticamente inutilizzabili) nei nostri modelli sperimentali.

In conseguenza si sarebbe dovuto poter disporre di un sistema che riproducesse nel modo più fedele possibile la condizione delle cellule umane

normali proliferanti in vivo ed in cui poter verificare la loro sopravvivenza ed integrità in seguito a trattamento chemioterapico tramite la misurazione di parametri affidabili in tal senso.

L'unico parametro in vitro realmente affidabile in tal senso è il potenziale clonogenico di tali cellule. Una misurazione che prescinda dalla verifica del potenziale clonogenico non sarebbe infatti quantitativamente indicativa della capacità delle cellule di dare luogo ad una popolazione di carattere clonale, ed in tal senso non sarebbe indicativa dell'applicabilità di un tale uso in vivo.

I tessuti umani in vivo più colpiti dagli effetti tossici associati alla somministrazione del chemioterapico, (in particolare i tessuti ematopoietici), si caratterizzano infatti nel loro funzionamento fisiologico proprio per la capacità delle relative cellule di dare luogo ad una popolazione di cellule figlie estremamente ampia andando incontro ad un cospicuo numero di divisioni cellulari. E' proprio il mantenimento di tale capacità, in seguito al trattamento chemioterapico, che assicura la completa ricostruzione del tessuto in vivo, e deve esser quindi attentamente verificata attraverso la valutazione del mantenuto potenziale clonogenico. Ciò anche in considerazione del fatto che è ormai noto che alcuni chemioterapici determinano, se non la eradicazione, comunque l'insorgere nelle cellule normali proliferanti di uno stato di senescenza. In conseguenza di tale stato le cellule non perdono la capacità di proliferare a breve termine - e risultano positive al relativo saggio - ma perdono immediatamente il potenziale clonogenico, non essendo più in grado di effettuare un alto numero di duplicazioni. In relazione a tutto ciò la semplice misurazione della capacità proliferativa delle cellule avrebbe dato un risultato inaffidabile, ed era evidente la esigenza di poter disporre di un

sistema di cellule tale da riprodurre in vitro la situazione patologica dei tessuti umani e da essere suscettibile alla misurazione del potenziale clonogenico delle cellule normali in esso.

Un tale sistema non era disponibile né ricavabile dalla semplice combinazione delle conoscenze di cui allo stato della tecnica.

SOMMARIO DELLA INVENZIONE

La presente invenzione ha per oggetto un metodo per ottenere la eradicazione completa e selettiva di cellule tumorali aventi la funzione di p53 inattiva da un contesto comprendente cellule tumorali e cellule normali proliferanti, sia esso una coltura mista in vitro, un coltura ex vivo, o i tessuti di un paziente in vivo.

Tale metodo si basa sull'uso combinato di due classi funzionali di composti, una classe denominata classe A costituita da composti aventi le seguenti caratteristiche:

- capacità inibire la citodieresi di cellule normali;
- reversibilità di azione almeno sulle cellule normali;
- capacità di non interferire significativamente con (ovvero mostrare una percentuale di inibizione minore o uguale al 50% de) i meccanismi di trasporto dei composti appartenenti ad una classe funzionale denominata classe B.

Tale classe B è costituita da composti aventi le seguenti caratteristiche:

- capacità di avere una azione citotossica nei confronti delle cellule attivamente proliferanti;
- capacità di avere una azione citotossica su cellule in fase intermitotica essenzialmente trascurabile, ovverosia una azione tale da non alterare

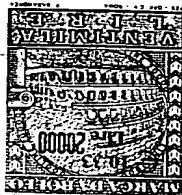
sostanzialmente la vitalità cellulare, il potenziale proliferativo di cellule in fase intermitotica e/o la fisiologia specifica del tipo cellulare.

Entrambe le classi sono per definizione classi aperte: tutti i composti che possiedano le caratteristiche sopra citate come identificative della classe A devono considerarsi ricompresi nella classe A; tutti i composti che possiedano le caratteristiche sopra citate come identificative della classe B devono considerarsi ricompresi nella classe B.

In particolare la classe A include le citocalasine (con la esclusione della citocalasina B), ed in particolare la citocalasina D (CD), le latrunculine ed in particolare la Latrunculina B (definita anche in seguito latrunculina), le jasplakinolidi ed in particolare la jasplakinolide, le condramidi ed in particolare la condramide B (definita nel seguito anche condramide), che sono capaci di inibire la citodieresi interferendo con l'equilibrio di polimerizzazione/depolimerizzazione dell'actina e la formazione dell'anello contrattile.

La classe B invece include farmaci quali: trifluorotimidina (3FT), citarabina (Ara C), 6-tioguanine (6ThG), ma anche 6-mercaptopurina, gemcitabina, fludarabina, floxuridina, ftorafur, metotrexato, trimetrexato, raltitrexed, edatrexato, lometrexol, idrossiurea, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, e 10-deacetil-baccatin III, irinotecan, topotecan, 9-amino-20(S)-camptothecina.

La presente invenzione si basa sulla sorprendente osservazione che l'uso combinato dei compo~~siti~~ di classe A e classe B come sopra definite consente la eradicazione in modo altamente efficace e selettivo di qualsiasi tipo di cellula tumorali che presenti la funzione di p53 inattiva. In particolare, in



esito all'uso combinato secondo la presente invenzione, le cellule normali mostrano non solo di essere state protette dall'azione eradicativa ma di aver pienamente mantenuto il loro potenziale proliferativo, e di essere quindi in grado di ricostituire la popolazione di cellule normali proliferanti presente nel contesto di partenza (sia esso una coltura o un tessuto in vivo).

In tal senso l'effetto tecnico sorprendente osservato in esito all'uso combinato di cui alla presente invenzione, non è dato tanto dalla possibilità di garantire una generica protezione delle cellule normali proliferanti dall'azione di un chemioterapico appartenente alla classe B, ma dalla possibilità di assicurare alle cellule normali proliferanti una protezione che è da un lato, talmente efficace e reversibile da consentire loro in esito alla fine del trattamento di recuperare la loro fisiologica capacità proliferativa, e dall'altro talmente selettiva da non interessare in alcun modo le cellule tumorali (e quindi da non indebolire in alcun modo l'azione eradicativa del composto B).

Per ottenere l'effetto sopra esposto è necessario comunque che il composto di classe A sia somministrato precedentemente al composto di classe B, in modo da consentire la determinazione della binucleazione delle cellule normali con conseguente arresto del ciclo cellulare e la contestuale multinucleazione delle cellule tumorali aventi la funzione p53 inattiva (le cellule continuano ad entrare in fase S senza soluzione di continuità), conseguente, in particolare, alle prime due capacità sopra elencate che caratterizzano i composti di classe A.

Tale condizione, nell'uso di composti aventi le caratteristiche di cui alla presente invenzione, consente infatti la protezione delle cellule normali proliferanti dall'azione citotossica del composto B.

Nella forma di realizzazione preferita la somministrazione delle due classi di composti deve essere effettuata secondo un metodo che comprende le seguenti operazioni in successione:

1. Pretrattamento delle cellule normali e tumorali con almeno un ~~composto di classe A per un tempo preferibilmente maggiore o uguale la durata media del ciclo cellulare delle cellule normali;~~

2. Trattamento combinato con almeno un composto di classe A ed almeno un composto di classe B per un tempo preferibilmente maggiore o uguale a quello della durata del ciclo cellulare delle cellule tumorali;

3. Post-trattamento con il quale si fa spurgare il composto di classe B dal contesto di partenza, prima di permettere la proliferazione delle cellule normali (fase necessaria per ottenere la protezione totale delle cellule normali nel contesto di partenza)

1. La fase di pretrattamento è funzionale alla determinazione della binucleazione delle cellule normali (blocco del ciclo cellulare) ed alla contestuale multinucleazione delle cellule tumorali (proseguimento del ciclo), conseguente alla azione del composto di classe A.

I parametri fondamentali per la definizione di tale fase sono dati dal tempo TP (Tempo di Pretrattamento) e dalle concentrazioni di composto di classe A utilizzate (CAP: concentrazione composto di classe A nella fase di pretrattamento).

Per quanto riguarda il tempo TP, in conseguenza dei meccanismi di azione del composto di classe A, esso può essere convenientemente definito in funzione della durata del ciclo cellulare delle cellule normali che si desidera proteggere. Nella forma preferita in vitro (in cui si ottiene la protezione della

totalità delle cellule normali in coltura), il tempo TP è maggiore o uguale alla durata media del ciclo delle cellule normali utilizzate in condizioni standard. Tale durata è differente da tipo cellulare a tipo cellulare (ad es. un fibroblasto primario ha un ciclo cellulare di circa 48h , le C3H10T1/2 di 24 ore). Il tecnico del ramo può comunque predefinirla facilmente (e definire automaticamente il TP) per ciascun tipo cellulare in base alle conoscenze di cui allo stato della tecnica.

Nel caso specifico del trattamento *in vivo* o *ex vivo*, tale tempo può essere definito come il tempo necessario affinché tutte le cellule normali fisiologicamente proliferanti nel nostro organismo (o presenti nella coltura nel caso del trattamento *ex vivo*) siano in grado di arrestarsi. Tale durata, a differenza dei sistemi *in vitro*, è univocamente predefinibile per tutti i tipi cellulari, dato che *in vivo ed ex vivo* la durata del ciclo cellulare è estremamente standardizzata. Secondo indicazioni sperimentali ottenute dagli inventori questo tempo è tra le 12 e le 96 ore.

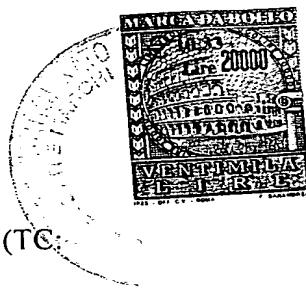
Questi tempi possono essere allungati o abbreviati in funzione della differente quantità di cellule normali proliferanti di cui si desidera ottenere la protezione.

Per quanto riguarda il parametro CAP, il valore corrispondente è da individuarsi nell'intervallo di concentrazioni utilizzabili per ottenere l'arresto in fase intermitotica delle cellule desiderate. Tale valore naturalmente varia da composto a composto in funzione del tipo cellulare utilizzato ma può essere facilmente determinato per ciascun singolo composto della classe dal tecnico del ramo sulla base delle conoscenze di cui allo stato della tecnica ed all'insegnamento di cui alla presente invenzione. In generale tale valore è

ricompreso in un intervallo di concentrazioni da 1 nM a 4 μ M. All'interno di questo intervallo è infatti possibile individuare i valori CAP dei singoli composti di classe A secondo la presente invenzione. Ad esempio per la citocalasina D il valore di CAP è preferibilmente ricompreso nell'intervallo 50 nM a 1,6 μ M, ed in una forma particolarmente preferita è di 400 nM.

In vivo la concentrazione da somministrare è quella necessaria a far sì che la concentrazione plasmatica stabile raggiunga il livello necessario per il raggiungimento dell'arresto in fase intermitotica delle cellule normali da proteggere. Anche in questo caso tale valore può essere facilmente determinato dal tecnico del ramo per ciascun singolo composto della classe in funzione della modalità di somministrazione prescelta sulla base delle conoscenze di cui allo stato della tecnica ed all'insegnamento di cui alla presente invenzione. In generale tale livello è compreso nell'intervallo sopra indicato (1 nM - 4 μ M). In ogni caso sia in vivo che in vitro deve considerarsi preferito per ciascun composto il valore di CAP corrispondente alla concentrazione minima necessaria per il raggiungimento dell'arresto in fase intermitotica delle cellule normali da proteggere (concentrazione minima funzionale).

2. Per quanto riguarda la fase di trattamento combinato, essa consiste nella somministrazione combinata del composto di classe A e del composto di classe B, per un tempo definibile nella sua forma di realizzazione preferita (in cui si raggiunge la eradicazione della totalità delle cellule tumorali aventi la funzione p53 inattiva presenti in coltura) come quell'intervallo di tempo all'interno del quale, in assenza della protezione data dal farmaco di classe A,



tutte le cellule tumorali presenti all'interno della coltura sono eradicate (TC: Tempo del trattamento Combinato).

Tale tempo può essere convenientemente calcolato in funzione del ciclo cellulare delle cellule bersaglio dell'azione del composto di classe B. Nella ~~forma di realizzazione preferita (per cui si ottiene la eradicazione completa di tutte le cellule tumorali)~~ è il tempo minimo necessario affinché le cellule tumorali aventi la funzione p53 inattiva completino almeno un ciclo cellulare. Il tempo TC analogamente al tempo TP non è predeterminabile in modo assoluto in vitro, dato che, al pari di quanto si è detto per le cellule normali, anche la durata del ciclo delle cellule tumorali in vitro varia secondo il tipo cellulare prescelto. In tal senso tale tempo è comunque facilmente determinabile da un tecnico del ramo sulla base delle conoscenze di cui allo stato della tecnica secondo l'effetto perseguito.

Il tempo TC infatti può essere variato in funzione dell'effetto eradicativo perseguito, per cui è possibile diminuirlo o aumentarlo secondo il grado di eradicazione voluto. In tal senso, è possibile aumentare questo tempo fino a farlo coincidere con la durata di due o più cicli cellulari, al fine di eliminare finanche quelle cellule tumorali che dovessero essere eventualmente sopravvissute al primo ciclo di trattamento. La durata di due cicli cellulari delle cellule tumorali aventi funzione di p53 inattiva, non costituisce comunque un limite massimo per il tempo TC. Per quanto riguarda la concentrazione del composto di classe A da somministrare nella fase del trattamento combinato (CATC: concentrazione del composto di classe A da somministrare nel trattamento combinato) essa è pari alla concentrazione necessaria per ottenere il mantenimento dell'arresto in fase intermititica delle

cellule normali che si vuole proteggere. In tal senso, in maniera del tutto analoga al CAP, la CATC varia da composto a composto in funzione del tipo cellulare utilizzato, ed il relativo valore può essere facilmente determinato per ciascun singolo composto della classe dal tecnico del ramo, sulla base delle conoscenze di cui allo stato della tecnica ed all'insegnamento di cui alla presente domanda.

La concentrazione CATC è generalmente corrispondente alla CAP ed in conseguenza può essere compresa nell'intervallo di concentrazione indicato per la fase di pretrattamento. In generale la CATC è mantenuta costante rispetto alla CAP, ma potrebbe essere anche arbitrariamente aumentata o diminuita all'interno dell'intervallo indicato. Nella forma di realizzazione preferita il composto di classe A deve essere somministrato senza soluzione di continuità tra le due fasi.

Per quanto riguarda la concentrazione di composto di classe B (CBTC: concentrazione del composto di classe B da somministrare nel trattamento combinato) essa è compresa in un intervallo che deve essere calcolato in funzione del tempo di trattamento, del tipo di cellula bersaglio e della emivita in coltura (o in vivo nel caso del trattamento in vivo) del farmaco di classe B somministrato. In condizioni standard di coltura essa è normalmente 100nM – 800 μ M. Tale concentrazione, comunque, in conseguenza dell'azione protettiva del composto di classe A, può essere aumentata fino ad anche dieci volte la concentrazione minima indicata

Tale possibilità, se può avere comunque una modesta rilevanza in vitro, dove il tempo di trattamento e le concentrazioni di farmaci utilizzati sono più facilmente controllabili da parte dell'operatore, acquista una maggiore

rilevanza nel trattamento in vivo in cui bisogna tenere conto delle variazioni conseguenti al trasporto del farmaco per via ematica ed alla loro emivita in circolo e nei tessuti tumorali.

Ad esempio è noto che in linea di massima tutti i chemioterapici analoghi dei nucleosidi hanno una emivita in vivo realmente breve (una-tre ore circa).

Inoltre è stato accertato che in seguito alla somministrazione di farmaci analoghi di nucleosidi si registrano picchi plasmatici di concentrazione per cui al fine di ottenere una concentrazione costante al livello cellulare sarebbe necessario provvedere ad un trattamento prolungato, la qual cosa comporta attualmente pesanti effetti collaterali. In seguito al pretrattamento con un composto di classe A sarebbe invece possibile procedere con perfusione del chemioterapico in vivo.

In conseguenza di ciò, in particolare si registra un ulteriore effetto sorprendente conseguente all'uso combinato di cui alla presente invenzione: sia il tempo di somministrazione del chemioterapico di classe B (che nel metodo coincide con il tempo TC) che la concentrazione stessa di tale chemioterapico di classe B (che nel metodo coincide con la concentrazione CBTC) nell'uso secondo la presente invenzione possono essere aumentate in modo estremamente rilevante sia nel trattamento in vitro o ex vivo, ma soprattutto nel trattamento in vivo.

Tale possibilità consente infatti di raggiungere anche in vivo le concentrazioni di chemioterapico di classe B adatte e/o il tempo di somministrazione necessario per la eradicazione di tutte le cellule tumorali nel contesto di partenza.

3. Per quanto riguarda la fase di post-trattamento, essa comprende una fase di spуро del composto di classe B dal contesto in cui si opera (cultura o trattamento in vivo).

La opportunità di prevedere una fase di spуро del composto di classe B ~~consegue alla osservazione sperimentale che, data la reversibilità della azione~~ dei composti di classe A sulle cellule normali, la contemporanea interruzione del trattamento con entrambi i composti, può determinare la morte di una certa percentuale di cellule normali.

Tale effetto è infatti conseguente alla azione del composto di classe B residuo in coltura sulle cellule normali, che in seguito alla mancata somministrazione del composto di classe A, ricominciano immediatamente a proliferare.

La durata della fase di spуро (o tempo della fase di spуро: TFS) in vitro è funzione della velocità di rinnovamento del terreno e della capacità da parte delle cellule normali di catabolizzare il composto di classe B. In vivo, oltre che dalla capacità delle cellule di catabolizzare il composto di classe B, il TFS è funzione anche dell'emivita ematica e/o tissutale del composto di classe B stesso.

Il TFS per il trattamento in vitro può essere in conseguenza convenientemente scelto in un intervallo di 1 ora – 48 ore.

Tale fase è necessaria solo nella forma di realizzazione preferita in cui si vuole ottenere una protezione completa della totalità delle cellule normali.

Sia in presenza che in assenza della fase di spуро in esito alla interruzione del trattamento con i composti di classe A e B, si procede generalmente permettendo la proliferazione delle cellule normali per un tempo variabile che può essere calcolato in vitro in funzione del tipo di osservazione da



compiersi, in vivo in funzione dell'effetto di ricostituzione del tessuto desiderato.

La stima minima della protezione assicurata in seguito a tale trattamento nel suo complesso è all'incirca di 500/1000 volte.

~~In conseguenza di tutto quanto esposto in precedenza ed in seguito, oggetto della presente invenzione è un metodo di eradicazione di cellule tumorali con funzione p53 inattiva, da una coltura *in vitro* comprendente cellule tumorali con funzione p53 inattiva e cellule normali averti capacità proliferativa, comprendente le seguenti operazioni in successione:~~

- a. somministrare a dette cellule tumorali con funzione inattivata ed a dette cellule normali averti capacità proliferativa un composto di classe A, detta classe A essendo costituita da composti averti le seguenti proprietà:
 - capacità di inibire la citodieresi di cellule normali;
 - capacità di avere un'azione reversibile almeno sulle cellule normali;
 - capacità di mostrare una percentuale di inibizione minore o uguale al 50% dei meccanismi di trasporto di composti di classe B, detta classe B essendo costituita da composti averti le seguenti proprietà:
 - capacità di avere una azione citotossica nei confronti delle cellule attivamente proliferanti;
 - capacità di non alterare sostanzialmente la vitalità cellulare, il potenziale proliferativo e/o la fisiologia specifica di cellule in fase intermitotica;

ottenendo in seguito alla somministrazione di detto composto di classe A l'arresto in fase intermitotica di almeno una parte di dette cellule normali averti capacità proliferativa;

b. mantenendo detta somministrazione del composto di classe A ed in seguito a detto arresto in fase intermitotica di almeno una parte di dette cellule normali averti capacità proliferativa, somministrare un composto di classe B, ottenendo la eradicazione selettiva di dette cellule tumorali averti la funzione di p53 inattiva;

c. interrompere la somministrazione di detto composto di classe A e di detto composto di classe B permettendo la proliferazione in coltura di dette cellule normali averti capacità proliferativa.

Di particolare rilievo è la modalità di esecuzione della operazione c. che comprende in successione le operazioni di:

c1. interrompere la somministrazione del solo composto di classe B e fare spurgare il composto di classe B dalla coltura mantenendo la somministrazione del composto di classe A;

c2. interrompere, dopo un tempo appropriato anche la somministrazione del composto di classe A e permettere la proliferazione in coltura delle cellule normali averti capacità proliferativa.

Forme perferite di realizzazione sono costituite dai seguenti casi: metodi in cui la durata della operazione a. sia maggiore o uguale alla durata del ciclo cellulare di dette cellule normali averti capacità proliferativa; metodi in cui la durata della operazione b. è maggiore o uguale alla durata del ciclo cellulare delle cellule tumorali con funzione inattivata; metodi in cui la durata della operazione c1. è maggiore o uguale a 3 ore. Quest'ultimo tempo è il tempo preferito considerando che in vitro è funzione della velocità di rinnovamento del terreno e della capacità da parte delle cellule normali a

catabolizzare in composto di classe B. Ulteriore caso particolare è quello in cui la successione di operazioni da a. a c. viene ripetuta nella coltura in vitro.

Per quanto riguarda il metodo in quanto realizzato con composti di classe A di particolare interesse sono i casi in cui tali composti sono scelti da un gruppo comprendente le citocalasine, con la esclusione della citocalasina B, le jasplakinolidi, le condramidi e le latrunculine ed in particolare da citocalasina D, jasplakinolide, condramide B e latrunculina B. In tale caso la concentrazione del composto di classe A è generalmente compresa nell'intervallo tra 1 nM e 4 μ M. In particolare per la citocalasina D, è compresa nell'intervallo tra 20 nM e 2 μ M; per la jasplakinolide, è compresa nell'intervallo tra 50 nM e 3 μ M; per la latrunculina B è compresa nell'intervallo tra 500nM e 2 μ M; per la condramide B, è compresa nell'intervallo tra 10 nM e 800 nM.

Per quanto riguarda i composti di classe B, di particolare interesse sono i casi in cui tali composti sono scelti da un gruppo comprendente trifluorotimidina, citarabina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, gemcitabina, fludarabina, floxuridina, fторafur, metotrexato, trimetrexato, raltitrexed, edatrexato, lometrexol, idrossiurea, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel e 10-deacetil-baccatin III, irinotecan, topotecan, 9-amino-20(S)-camptothecina. In tale caso la concentrazione del composto di classe B è generalmente maggiore o uguale a 100nM, o compresa nell'intervallo tra 100nM e 800 μ M. In particolare per la trifluorotimidina tale concentrazione è maggiore o uguale a 40 μ M, in particolare compresa nell'intervallo da 40 μ M a 800 μ M, preferibilmente 50 μ M; per la citarabina, tale concentrazione è generalmente maggiore o uguale

a 40 μM , in particolare compresa nell'intervallo da 40 μM a 600 μM , preferibilmente 40 μM ; per la 6-tioguanina, tale concentrazione è generalmente maggiore o uguale a 50 μM , in particolare una concentrazione compresa nell'intervallo da 50 μM a 600 μM , preferibilmente 100 μM .

~~Ulteriore oggetto della presente invenzione è l'uso di un composto di classe A in combinazione con un composto di classe B, per eradicare cellule tumorali con funzione di p53 inattiva da una coltura in vitro comprendente dette cellule tumorali e cellule normali, l'uso di un composto di classe A per la preparazione di farmaci utilizzabili nella terapia di forme tumorali con funzione p53 inattiva, in particolare per le forme tumorali con funzione p53 inattiva a basso potenziale proliferativo.~~

Ulteriore oggetto della presente invenzione è dato da un composto di classe A per uso come medicamento, da composizioni farmaceutiche comprendente almeno un composto di classe A ed un veicolo farmaceuticamente compatibile utilizzabile nel trattamento di forme tumorali con funzione p53 inattiva, in particolare per le forme tumorali che presentano un basso potenziale proliferativo, e da composizioni farmaceutiche comprendenti almeno un composto di classe B ed un veicolo farmaceuticamente compatibile, utilizzabili in combinazione con almeno una delle composizioni comprendenti un composto di classe A sopra menzionate nel trattamento di forme tumorali con funzione p53 inattiva, in particolare per le forme tumorali che presentano un basso potenziale proliferativo.

Oggetto della presente invenzione è inoltre costituito da un kit per la eradicazione di cellule tumorali aventi la funzione p53 inattiva da una coltura



di cellule comprendente dette cellule tumorali aventi la funzione p53 inattiva e cellule normali in attiva proliferazione, comprendente:

i. almeno una composizione comprendente almeno un composto di classe A come definito nella rivendicazione 1;

ii. ~~almeno una composizione comprendente almeno un composto di~~ classe come definito nella rivendicazione 1;

in cui dette composizioni di cui ai punti i. ed ii. sono somministrabili in successione secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione del metodo sopra esposto.

Casi particolari di tali usi, composizioni e kit, sono dati dal fatto di utilizzare come composti di classe A e classe B i composti sopra indicati come appartenenti alla classe A ed alla classe B rispettivamente.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è infine l'uso delle cellule C3H10T1/2 o di cellule da esse derivate, per la messa a punto di metodi per eradicare cellule tumorali con funzione p53 inattiva da colture miste comprendenti dette cellule tumorali con funzione p53 inattiva e cellule normali, per la identificazione di composti di classe A e/o di classe B.

L'invenzione verrà meglio descritta con l'aiuto delle figure annesse.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La figura 1 riporta lo schema dei tempi del metodo di cui alla presente invenzione nella sua forma preferita condotta su un sistema formato da cellule C3H10T1/2 e C3H10T1/2 ν -src/ ν -myc in forma tabellare.

I termini T0h, T24h, T72h, T84h indicano i tempi del metodo espressi in ore; in particolare T0h corrisponde a 0 ore, T24h corrisponde a 24 ore, T72h corrisponde a 72 ore e T84h corrisponde a 84 ore.

Nella riga 1 è riportato il tempo del trattamento effettuato con il solo farmaco di classe A dal tempo T0 al tempo T84.

Nella riga 2 è riportato il tempo del trattamento effettuato con il solo farmaco di classe B dal tempo T24 al tempo T72.

~~Nella riga 3 sono riportati i tempi del metodo di cui alla presente invenzione~~
in quanto applicato nella sua forma preferita alle cellule sopra indicate: in particolare è evidenziato come il trattamento con il farmaco di classe A sia effettuato dal tempo T0 al tempo T84, ed il trattamento con il farmaco di classe B si sovrapponga al trattamento con il farmaco di classe A dal tempo T24 al tempo T72. Il tempo T0-T24 è il tempo TP, il tempo T24-T72 è il tempo TC, il tempo T72-T84 è il tempo TFS, il tempo 10-15 giorni (10-15 gg) è il tempo della fase di ripresa della proliferazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELLA INVENZIONE

La elaborazione del metodo di cui alla presente invenzione è avvenuta in esito alla strategia sperimentale di seguito esposta.

Il punto di partenza è stato la osservazione che ostacolo principale all'ottenimento di una eradicazione delle cellule tumorali che fosse selettiva rispetto alle cellule normali proliferanti presenti nei tessuti tumorali *in vivo* è il fatto che, i due tipi di cellule si trovano in uno status di completa indistinguibilità, in relazione al meccanismo di azione dei farmaci chemioterapici.

In tal senso, la ipotesi di base è stata che la preliminare creazione di condizioni tali da differenziare lo status delle cellule normali da quello delle cellule tumorali, e da differenziarlo in modo che solo le cellule tumorali mantenessero la sensibilità all'azione eradicativa del chemioterapico, potesse

consentire la elaborazione di un metodo di eradicazione delle cellule tumorali che ad una elevata efficacia potesse unire una altrettanto elevata selettività di eradicazione.

In tal senso era necessario in linea teorica individuare:

1. ~~una classe di composti (denominata dagli inventori classe B) che in~~ conseguenza della instaurazione di tale "status", fosse capace di esercitare una azione citotossica sulle cellule tumorali e di esercitare una azione citotossica trascurabile nei confronti delle cellule normali.
2. una classe di composti (denominata dagli inventori classe A) che fosse capace di determinare la instaurazione di tale "status differenziale", con un'azione reversibile nei confronti delle cellule normali, e tale da non interferire in modo rilevante con l'azione eradicativa del farmaco di classe B sulle cellule tumorali.

In tal senso i composti capaci di determinare la binucleazione/multinucleazione (ed in particolare le citocalasine) da un lato ed i chemioterapici, in particolare del tipo antimetaboliti, dall'altro erano in partenza potenziali componenti delle classi A e B rispettivamente.

Le informazioni di cui allo stato della tecnica come è stato evidenziato però non erano sufficienti per procedere alla automatica inclusione delle molecole in tali classi, anzi consentivano a priori la esclusione di almeno una delle citocalasine dalla classe A (la citocalasina B) a motivo della forte capacità di interferire con il meccanismo di assunzione di alcuni chemioterapici nota in arte (vedi stato della tecnica). In tal senso è stato necessario verificare per tutti i vari composti candidati (in quanto capaci di determinare lo status di binucleazione/multinucleazione o in quanto chemioterapici), la sussistenza

delle altre caratteristiche delle due classi (come la reversibilità di azione per le citocalasine o analoghi, la non interferenza reciproca tra i composti canadidati delle due classi, e gli effetti tossici su cellule normali proliferanti arrestati allo stadio di binucleate i chemioterapici)

~~Sarebbe stato inoltre comunque necessario sperimentare se ed in che misura e~~
secondo quali modalità, all'uso combinato di tali composti avesse potuto essere associato un effetto selettivamente protettivo nei confronti delle sole cellule normali proliferanti ed un effetto selettivamente eradicativo nei confronti delle sole cellule tumorali, ed in caso di esito positivo individuare i tipi di cellule tumorali nei cui confronti tale uso avesse potuto dimostrarsi funzionale.

La necessità di operare in modo rigoroso tale ultima verifica era conseguente alle informazioni contraddittorie presenti in arte sulla possibilità di instaurare lo status di binucleazione/multinucleazione per tutte le diverse forme tumorali (vedi stato della tecnica)

In tal senso gli inventori hanno proceduto elaborando la seguente strategia sperimentale.

a. Costruzione di un sistema modello

Il primo passo è stato quello di identificare e costruire un sistema da utilizzare per la definizione dei composti da utilizzare (di entrambe le classi) e dei parametri del relativo uso combinato.

Tale sistema come è stato evidenziato nella trattazione dello stato della tecnica, non era disponibile né era facilmente ricavabile (vedi stato della tecnica)



Ciò ha determinato la necessità di dover compiere una serie notevole di esperimenti, per la identificazione di un tipo cellulare che potesse presentare gli opportuni requisiti.

Al fine di poter essere soggetto alle misurazioni sperimentali quantitative atte alla dimostrazione e validazione del modello, tali cellule normali avrebbero dovuto essere stabili ed al contempo mantenere la capacità di binucleare in seguito a somministrazione di farmaci di classe A. Da una tale cellula era poi necessario poter ricavare la rispettiva controparte tumorale, che doveva essere essa stessa stabile, avere carattere policlonale e aver perso la capacità di rimanere binucleata in seguito al trattamento con farmaci di classe A, dando luogo a multinucleazione.

Data la impossibilità di poter disporre delle naturali cellule bersaglio in vivo (vedi stato della tecnica) e di poter utilizzare cellule primarie (non utilizzabili in vitro negli approcci sperimentali adottati dagli inventori finalizzati alla misurazione del potenziale clonogenico), sono state vagliate le linee cellulari usualmente utilizzate in laboratorio. Si è dovuto però escludere la maggior parte di esse in quanto tendente naturalmente ad evolvere verso uno stato trasformato (con conseguente perdita della capacità di rimanere binucleate a seguito del trattamento con classe A).

Sono stati necessari parecchi tentativi al fine di individuare le cellule adatte. Alla fine si è giunti alla scelta delle C3H10T1/2 (fibroblasti di topo) le quali si sono rivelate infatti relativamente stabili, hanno mostrato di mantenere il potenziale clonogenico in coltura, ed hanno mostrato la capacità di binucleare in seguito alla somministrazione della citocalasina D (CD) che è stato da noi scelto come rappresentativo dei potenziali farmaci di classe A.

Era necessario a questo punto costruire la loro controparte tumorale e verificare che essa stessa avesse caratteristiche funzionali per il sistema. La costruzione di tale controparte tumorale ha a sua volta implicato il superamento di una serie di difficoltà.

La principale risiedeva nella necessità di dover ottenere delle cellule che, per consentire il massimo grado di affidabilità delle misurazioni per le finalità della presente invenzione, fossero stabilmente trasformate ed avessero al contempo preferibilmente carattere policlonale. Per la loro natura estremamente vicina alle cellule primarie, il solo trattamento che assicura per le cellule C3H10T1/2 di ottenere una popolazione tumorale stabile e policlonale allo stesso tempo è la trasformazione in sequenza con due oncogeni retrovirali. Nel nostro caso abbiamo deciso di utilizzare gli oncogeni *v-src* e *v-myc*.

Per quanto noto in arte però non era prevedibile che la trasformazione con tali oncogeni (come del resto con tutti gli oncogeni retrovirali) potesse dare luogo a cellule tumorali capaci di multinucleare in seguito a somministrazione dei potenziali composti di classe A. In conseguenza una volta ottenuto tale sistema, è stato comunque necessario saggiare la capacità delle cellule cotrasformate con *v-src* e *v-myc* di dare luogo a multinucleazione in seguito a somministrazione di tali composti (in particolare è stata utilizzata la citocalasina D considerato come composto rappresentativo della classe A).

Tali saggi hanno dato un esito positivo, fornendo anche una prima indicazione della possibile esistenza di meccanismi, sottesi alla determinazione della multinucleazione nelle cellule tumorali, differenti rispetto a quelli noti in arte (vedi stato della tecnica) e quindi della

applicabilità dell'eventuale uso combinato nei confronti di un numero maggiore di cellule tumorali rispetto a quello prevedibile in base alle conoscenze dello stato della tecnica.

In conseguenza di tale risultato si è provveduto a costruire un sistema modello, comprendente una coltura di sole C3H10T1/2 che sono cellule normali, una coltura di cellule C3H10T1/2v-src/v-myc (tumorali) e una coltura mista formata da cellule C3H10T1/2 e C3H10T1/2v-src/v-myc. Tale sistema è stato quindi innanzitutto sottoposto ad una serie di esperimenti mirati all'analisi dello stato di nucleazione cellulare e della capacità ad effettuare sintesi di DNA in presenza o in assenza di citocalasina D, (descritto estesamente nell'esempio 1) per verificarne la funzionalità, verificando cioè la instaurazione di tale "status differenziale" in seguito a somministrazione di citocalasina D.

Il risultato di tale serie di esperimenti ha confermato la validità del sistema costruito (vedi esempio 1)

In conseguenza di tali risultati, inoltre, sono state ottenute anche una serie di indicazioni relative alle proprietà della citocalasina D in quanto farmaco di classe A. In particolare è stata verificata in capo alla citocalasina D la sussistenza di uno dei più importanti requisiti per la appartenenza alla classe A: la reversibilità di azione.

Si è visto infatti che in seguito ad interruzione della somministrazione di tale composto, le cellule normali (le uniche di interesse) sia in coltura monotipica che in coltura mista, non solo ricominciano a proliferare normalmente uscendo dallo stadio di binucleate, ma mostrano di aver largamente mantenuto il loro potenziale clonogenico.

In tal senso, diveniva importante confermare questo dato e verificare la sussistenza degli altri requisiti testando la citocalasina D in combinazione con la trifluorotimidina (3FT) scelta come rappresentativo dei potenziali farmaci di classe B, e la contestuale definizione delle condizioni necessarie per l'uso ~~combinato delle due sostanze.~~

b. Definizione del metodo di eradicazione selettiva

Sono stati condotti a tal fine una serie di esperimenti che hanno consentito di ricavare i tempi, concentrazioni e modalità di somministrazione dei farmaci delle due classi.

Tali esperimenti sono stati condotti sul sistema validato costituito dalle tre colture sopra definite, in cui la coltura mista è stata costruita in modo da essere costituita per la maggior parte da cellule normali e per la minor parte da tumorali (situazione *in vivo*). In tutte e tre le colture entrambi i tipi cellulari (normali e tumorali) sono stati tenuti in condizioni di proliferazione attiva per evitare distorsioni del risultato, in seguito all'eventuale arresto di cellule per cause indipendenti dalla somministrazione dei composti.

Si è provveduto quindi a somministrare CD e 3FT a diversi dosaggi e a diversi tempi, avendo cura di effettuare sempre i dovuti controlli al fine di trovare la combinazione più efficace dei parametri tempi/concentrazioni somministrate. Gli esperimenti più significativi al riguardo sono quelli esposti estesamente negli esempi 2 e 3, che si riferiscono alla combinazione dei parametri dimostratisi alla fine, ottimale per ottenere l'effetto della eradicazione completa delle cellule tumorali e della efficiente protezione delle cellule normali, sia in esito ad una verifica qualitativa (vedi esempio 2) che in esito ad una verifica quantitativa (vedi esempio 3).



In tal modo si è giunti anche alla determinazione delle fasi del metodo nella forma preferita come descritto nel sommario della invenzione, e schematizzato in figura 1.

In particolare per quanto riguarda la fase di pretrattamento, la relativa durata è stata di 24 ore (pari alla durata del ciclo cellulare delle cellule C3H10T1/2 utilizzate).

La concentrazione di citocalasina D utilizzata è stata di 400 nM, ma anche concentrazioni comprese in un intervallo che va da 50 nM a 1,6 μ M, si sono rivelate ugualmente utilizzabili.

Per quanto riguarda la fase di trattamento combinato, essa è stata condotta per 48 ore (tempo necessario per il compimento da parte delle cellule tumorali C3H10T1/2 ν -src/ ν -myc di due cicli cellulari) ed inoltre tempo minimo per la completa uccisione di tutte le cellule dopo trattamento con il solo farmaco di classe B.

La concentrazione della citocalasina D è stata mantenuta costante rispetto alla fase precedente, anche se avrebbe potuto essere arbitrariamente aumentata o diminuita. La concentrazione di 3FT somministrata è stata di 40 μ M. ma anche concentrazioni comprese in un intervallo che va da 10 μ M a 600 μ M, si sono rivelate ugualmente utilizzabili.

Per quanto riguarda la fase di post-trattamento: la fase di spурgo essa è stata condotta per un tempo di 12 ore e come si è detto in precedenza essa è funzione della (in particolare è inversamente proporzionale alla) velocità di eliminazione del farmaco di classe B .

Per quanto concerne invece la ripresa della proliferazione delle cellule normali essa come è già stato detto, è per definizione un tempo variabile. Nel

caso specifico dovendosi effettuare un saggio di formazione di colonie in vitro, il tempo appropriato è quello necessario per ottenere delle colonie visibili (che varia secondo il tipo cellulare prescelto). Nella prima serie di saggi finalizzati alla verifica della eradicazione completa delle cellule tumorali della protezione completa delle cellule normali, è quindi il tempo richiesto affinchè il monostrato di cellule normali si riformi correttamente a densità, e che eventuali foci di cellule tumorali siano visibili, con una dimensione quindi pari ad almeno 2 mm (vedi esempio 3). E' necessario sottolineare in proposito che, al fine di ottenere un risultato affidabile, tale tempo è stato calcolato (e deve essere sempre calcolato) in base alla sincronizzazione del gruppo sperimentale di controllo. Ciò significa che è necessario tenere conto del diverso tempo di ripresa della proliferazione delle cellule che costituiscono il controllo, le quali hanno infatti un tempo di ripresa minore rispetto alle cellule trattate che essendo state arrestate hanno tempi di formazione delle colonie maggiore rispetto al controllo, secondo gli standard enunciati.

Tale tempo considerato nello specifico è compreso in un intervallo da 7 a 15 giorni, in considerazione dei tempi del gruppo sperimentale di controllo. In particolare ad esempio se le cellule (sia normali che trasformate) di controllo hanno un post-trattamento di 7 giorni, le cellule trattate con citocalasina D lo hanno di 10 giorni e così via.

La scelta della formazione di colonie (che dà una indicazione diretta del potenziale clonogenico delle cellule) come saggio di funzionamento, rispetto ad altri saggi (come ad esempio la conta delle cellule su piastra) usati per la misurazione della capacità proliferativa, è stata dettata dalla esigenza di dover

verificare le condizioni di instaurazione e reversione di tale "status", in modo estremamente rigoroso. Solo in questo modo i risultati della sperimentazione successiva avrebbero potuto essere realmente indicativi di una eradicazione completamente efficace ed al contempo selettiva nei confronti delle sole cellule tumorali.

Come accennato, questi parametri sono stati verificati sul sistema sopra indicato sia in modo qualitativo (vedi esempio 2) sia in modo quantitativo (vedi esempio 3). In esito al confronto dei valori ottenuti nell'esperimento di carattere quantitativo è stato quindi possibile attribuire un valore alla protezione sulle cellule normali garantita dal metodo (vedi esempio 3).

c. Definizione della classe A:

In conseguenza di tali saggi nell'ottenere indicazioni precise relativamente all'uso combinato sono state contemporaneamente ottenute indicazioni in senso positivo sulla sussistenza in capo alla citocalasina D ed alla 3FT delle caratteristiche delle classi A e B rispettivamente (vedi paragrafo precedente).

In tal senso, al fine di ottenere una conferma di tali dati sono stati condotti ulteriori esperimenti. In particolare con riferimento al requisito della capacità di non interferire con l'azione del farmaco di classe B, è stato eseguito un esperimento di formazione di colonie su un sistema formato dalle sole cellule tumorali, in cui sono stati confrontati gli effetti della somministrazione della citocalasina D con gli effetti della somministrazione della citocalasina B (CB), farmaco noto in arte per la capacità di interferire con il trasporto di chemioterapici.

Tale esperimento è estesamente descritto nell'esempio 4. Si è avuto in questo modo la possibilità di osservare che mentre la CB, come atteso, interferisce

pesantemente con la assunzione della 3FT assicurando un certo grado di protezione alle cellule tumorali, la CD mostra di non proteggere in alcun modo tali cellule (vedi esempio 4). La somministrazione di 3FT, congiuntamente alla somministrazione di CD, effettuata secondo i parametri della eradicazione completa e massimamente selettiva, determina infatti la eradicazione completa delle cellule tumorali in coltura, mentre la somministrazione di CB alle stesse condizioni si traduce in una eradicazione soltanto parziale e quindi insoddisfacente.

In tal senso tale dato, oltre a confermare la CD come farmaco di classe A, conferma i risultati ottenuti in arte nel senso della esclusione della citocalasina B dalla classe A come definita.

Il passo successivo nel senso quindi della definizione della classe A è stato quello di verificare quali composti mostrassero un comportamento funzionale del tutto analogo a quello della citocalasina D e potessero così essere inclusi nella classe A.

A questo fine è stata condotta la stessa serie di esperimenti descritta nell'esempio 1, utilizzando altri composti candidati, al posto della citocalasina D. In particolare sono state considerate le latrunculine le jasplakinolidi e le condramidi. Tutti i composti esaminati ed in particolare latrunculina B, jasplakinolide, condramide B hanno mostrato un comportamento del tutto equivalente a quello della citocalasina D, mostrando anche una azione reversibile sul sistema. (vedi esempio 5)

In particolare nel nostro sistema modello la jasplakinolide e la condramide hanno mostrato una azione estremamente reversibile, talmente reversibile che sulle cellule tumorali queste sostanze interferiscono con la polimerizzazione



del citoscheletro di actina ma non è evidente la inibizione della citodieresi.

Tale effetto non pregiudica comunque né la efficacia dell'azione del farmaco di classe B sulle cellule tumorali, né la efficacia della loro stessa azione protettiva sulle cellule normali (vedi esempio 5).

Tali composti inoltre, sottoposti ad un saggio di incorporazione di timidina triziata (utilizzata come analogo dei farmaci di classe B limitatamente ai meccanismi di trasporto) estesamente descritto nell'esempio 6, hanno mostrato di non inibire la assunzione di 3FTtimidina, e di rispondere positivamente anche al requisito della non interferenza con l'azione del composto di classe B.

La necessità di effettuare questa prova deriva dal fatto che, anche se la capacità di interferire con l'assunzione di composti di classe B può essere nota o supposta in capo ad alcuni potenziali composti di classe A, è stato comunque necessario verificare se ed in che termini la interferenza esercitata potesse essere rilevante ai fini della eradicazione delle cellule tumorali. In tal senso era possibile che una molecola che interferisce con il trasporto dei composti di classe B lo facesse in modo da consentire comunque la eradicazione, e quindi che fosse comunque compresa nella classe A ovvero da non consentirla e quindi da esserne esclusa.

In tal senso la citocalasina B, farmaco capace di inibire il trasporto è stato considerato come riferimento negativo nella conduzione degli esperimenti (vedi esempio 6).

La soglia di inibizione del trasporto al di sopra della quale la inibizione è considerata eccessiva per l'uso combinato di cui alla presente invenzione, in conseguenza dei risultati ottenuti, è stata fissata nel 50% di inibizione del

trasporto del farmaco di classe B. In tal senso anche i composti che mostrano una modesta capacità di inibire il trasporto sono considerati rientrare all'interno della classe A. I composti con capacità di inibizione superiore sono esclusi in quanto non funzionali nel metodo in questione.

In considerazione di ciò, la condramide e la jasplakinolide e la latrunculina sono state definitivamente incluse nella classe A, in quanto pienamente rispondenti ai relativi requisiti.

I dati ottenuti con questi esperimenti hanno inoltre trovato conferma nell'uso diretto di tali farmaci nel metodo come sopra descritto. Tutti i farmaci di classe A identificati (condramide, jasplakinolide e latrunculina) si sono mostrati funzionali nel metodo (dati non riportati). In particolare tutti i farmaci di classe A sono stati testati secondo gli stessi tempi descritti per la citocalasina D, e utilizzati in un range di concentrazioni compreso tra 1 nM e 4 μ M.

In esito a tali esperimenti sono stati individuati i valori CAP e CATC da attribuire ad alcuni composti di classe A in quanto intervallo di concentrazione per cui si ottiene il blocco della citodieresi sulle cellule normali, ed all'interno di esso il valore della concentrazione minima necessaria per il raggiungimento di questo effetto che costituisce la forma di realizzazione preferita. Tali valori sono quelli riportati nel sommario della invenzione.

In conseguenza di tutte queste sperimentazioni, dalla analisi delle caratteristiche proprie dei composti positivi è stato possibile definire la classe A in quanto classe funzionale di composti utilizzabili nel metodo di cui alla

presente invenzione secondo le caratteristiche indicate nel sommario della invenzione.

In tal senso la esecuzione dell'esperimento di cui all'esempio 5, con composti candidati può essere considerata funzionale alla definizione di nuovi farmaci di classe A, che è come sopra precisato una classe aperta per definizione.

Tutti i composti aventi le caratteristiche sopra evidenziate devono infatti considerarsi incluse nella classe.

d. Definizione della classe B

In seguito a ciò, il passo successivo è stato quindi quello di identificare in maniera analoga a quanto fatto per la citocalasina D, eventuali ulteriori composti che mostrassero una azione equivalente alla 3FT nell'uso combinato, e rispondessero ai requisiti della classe B come definita.

L'azione della 3FT nel sistema ha rivelato come tale composto possieda in pieno i requisiti della classe B di composti in quanto classe funzionale di composti utilizzabili nel metodo di cui alla presente invenzione, che alla luce della sperimentazione effettuata sono stati definiti come riportato nel sommario della invenzione.

Per la individuazione di altri componenti la classe B sono stati quindi eseguiti gli stessi saggi riportati negli esempi 2 e 3, sostituendo alla 3FT vari composti candidati, di cui è stata quindi innanzitutto verificata la funzionalità nel metodo. Essa è infatti la prima indicazione della sussistenza dei requisiti necessari e sufficienti per affermare la appartenenza alla classe B..

Di particolare rilievo gli esperimenti condotti con due farmaci che sono comunemente usati in chemioterapia: l'Ara C (detta anche citarabina) o la

dueclorodesossiadenosina (2ClAd), noti per la loro azione su cellule altamente proliferanti, estesamente descritto nell'esempio 7.

Il risultato rilevante è che in tutte e due i casi (Ara C e 2ClAd) si è osservata una drastica diminuzione se non addirittura l'assenza dei foci di trasformazione e, la contemporanea riformazione del monostrato di cellule normali (vedi esempio 7).

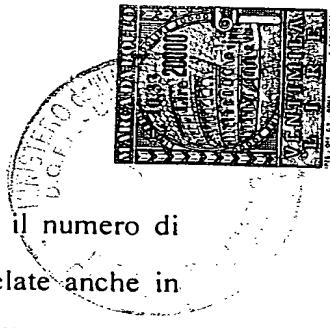
Nel caso però del trattamento combinato con la 2ClAd, il monostrato di cellule normali si riformava più lentamente (è stato necessario un tempo di ripresa della proliferazione di 14 giorni contro circa i 7 giorni del metodo condotto con Ara C o 3FT) impiegando quasi il doppio del tempo rispetto agli altri due farmaci testati.

Inoltre le cellule di tale monostrato hanno un aspetto senescente, e la densità di saturazione del monostrato (numero di cellule per unità di superficie) è molto più bassa rispetto agli altri due casi.

Questi dati relativi al tempo della fase di ripresa della proliferazione e all'aspetto delle cellule normali alla fine del trattamento complessivo, sono indicativi dell'esistenza di un certo effetto tossico della 2ClAd anche sulle cellule normali in seguito al trattamento combinato.

In tal senso si è ritenuto necessario disporre di una controprova per la sussistenza del requisito della assenza di citotossicità su cellule in fase intermitotica, eseguendo la serie di esperimenti estesamente descritti nell'esempio 8.

Tali esperimenti sono stati diretti alla analisi della tossicità degli antimetaboliti su cellule arrestate in G0/G1 (stato del ciclo cellulare in cui si arrestano le cellule normali in seguito a somministrazione dei composti di



classe A) per confluenza o depravazione di siero. Osservando il numero di cellule sopravvissute, ed il numero di quelle che si sono rivelate anche in grado di rientrare in ciclo, si è avuto conferma dei risultati dell'esperimento descritto nell'esempio 7. Infatti dei cinque antimetaboliti utilizzati i tre risultati positivi all'esperimento descritto nell'esempio 7, si sono rivelati anche in questo caso perfettamente funzionali (3FT, Ara C, 6ThG).

La sola 2ClAd, che nel precedente esperimento di cui all'esempio 7 aveva dato problemi di tossicità, e la doxorubicina, che pure secondo quanto descritto in arte avrebbe dovuto mostrarsi funzionale, danno invece luogo ad una completa inibizione dell'ingresso in sintesi (vedi esempio 8). La Doxorubicina ha inoltre mostrato un forte effetto citotossico.

In tal senso mentre l'Ara C e la 6ThG in esito a tali esperimenti sono stati inclusi nella classe B, la 2ClAd e la doxorubicina, data la tossicità mostrata, sono state escluse.

In generale possono considerarsi inclusi nella classe B tutti i composti che mostrano una tossicità tale da non alterare sostanzialmente la vitalità cellulare ed il potenziale proliferativo di cellule in fase intermitotica e la fisiologia specifica del tipo cellulare.

La esecuzione di questo esperimento con composti candidati, in associazione agli ovvi saggi di citotossicità su cellule proliferanti, può comunque servire a definire nuovi farmaci di classe B, che, come la classe A, è ovviamente una classe aperta per definizione.

In esito a questi esperimenti, al fine di verificare la validità delle concentrazioni utilizzate e soprattutto la possibilità di aumentarle e/o aumentare il tempo di somministrazione dei farmaci di classe B, sono stati

condotti una serie di esperimenti estesamente descritti nell'esempio 9, nel quale si è testata la funzionalità di varie concentrazioni dei farmaci di classe B aumentandole fino a 10 volte.

Questo avrebbe costituito naturalmente un ulteriore vantaggio conseguente alla applicazione del metodo della invenzione, dato che è chiaro che la maggior parte dei tumori sarebbe sicuramente eradicato in seguito a trattamenti con concentrazioni di chemioterapico 10 volte più alta di quelle attualmente utilizzate. Ciò non è attualmente possibile perché la dose di chemioterapico somministrabile è limitata dalla sua tossicità (vedi stato della tecnica).

Il risultato della serie di saggi descritta nell'esempio 9 è che mentre la trifluorotimidina comincia a mostrare una certa tossicità ad $800 \mu\text{M}$, l'Ara C inizia ad essere tossica tra 200 e $400 \mu\text{M}$. I due farmaci realmente tossici e già esclusi dalla classe B (2ClAd e Doxorubicina), utilizzati come controllo positivo danno ovviamente una forte tossicità già alle concentrazioni minime funzionali.

Da tali risultati, anche e soprattutto in quanto comparati con quelli relativi ai due farmaci realmente tossici e comunque non di classe B, è possibile affermare che in seguito a chemoprotezione ottenuta con il metodo di cui alla presente invenzione è possibile aumentare fino a 10 volte la concentrazione di chemioterapico in quanto pur essendo rilevata una certa tossicità in seguito ad aumento delle concentrazioni con i composti inclusi nella classe B come definita, essa è comunque trascurabile (vedi i dati su 2Cl e Doxorubicina). Per la sola Ara C in quanto farmaco di classe B, un aumento del dosaggio di 6 volte comincia a comportare una tossicità di rilievo.

e. Estensione della validità dei risultati ottenuti al sistema umano

In una ultima fase della ricerca, nell'ottica perseguita del massimo rigore dei parametri adottati e della massima affidabilità del risultato nel senso della applicabilità alla situazione patologica nel sistema umano in vivo, si è cercata una conferma dell'applicabilità alle cellule umane dei risultati ottenuti sulle cellule modello che pure erano state selezionate al fine di riprodurre il più fedelmente possibile le condizioni in vivo o ex vivo (vedi sopra).

In tal senso sono stati eseguiti gli esperimenti descritti estesamente nell'esempio 10. Essi confermano che la somministrazione dei composti di classe A su cellule tumorali (i glioblastomi Lipari, T97, U973), e normali (fibroblasti LH e DH) umane determina gli stessi effetti registrati sulle cellule del sistema modello CH310T1/2v-src/v-myc e C3H10T1/2 rispettivamente.

In aggiunta a ciò si è registrato un effetto ancora più sorprendente relativamente all'uso di condramide B. Essa sulle linee umane ha mostrato la capacità di indurre multinucleazione su una sola di queste linee (le Lipari), e addirittura di uccidere da sola le altre due (T97, U973). In tal senso su cellule umane la sua azione si è rivelata capace non solo a proteggere le cellule normali ma a cooperare con l'azione del farmaco di classe B sulle cellule tumorali.

La piena validità dell'uso combinato dei farmaci delle due classi come sopra esposto anche sul sistema umano è stata quindi in conseguenza pienamente dimostrata.

f. Analisi dello status di binucleazione/multinucleazione relativo a cellule normali/tumorali e definizione dell'ambito di applicazione del metodo

In parallelo agli esperimenti descritti nei paragrafi precedenti sono stati condotti altri esperimenti volti a verificare l'ambito effettivo di applicazione dell'uso combinato delle due classi di farmaci.

In tal senso infatti la totale assenza di informazioni relativamente al meccanismo che presiede alla determinazione dello stato di binucleazione/multinucleazione delle cellule normali/tumorali rispettivamente, e la presenza di informazioni contraddittorie relativamente ai tipi di cellule nei cui confronti esso fosse determinabile (vedi stato della tecnica) rendeva del tutto imprevedibile l'ambito di applicazione dell'uso combinato dei composti di classe A e B, sperimentato. In particolare non era noto se esso potesse instaurarsi su un solo tipo, su più tipi o su tutti i tipi di forme tumorali conosciute.

Una analisi in tal senso avrebbe infatti definito nel modo opportuno la portata e la funzionalità del metodo elaborato. A questo scopo sono stati condotti gli esperimenti descritti estesamente negli esempi 11 e 12.

In prima battuta con la serie di saggi descritti nell'esempio 11, si è voluto verificare se la determinazione di tale status potesse essere conseguente alla perdita della funzione associata ad uno o più "tumor suppressor genes" (denominati in seguito anche TSG) (18). Le indicazioni relative al comportamento delle cellule in conseguenza del mantenimento o della perdita della funzione associata a questi geni risultano infatti direttamente indicative delle forme tumorali a cui sono normalmente associate (17).

A tal fine è stato condotto un esperimento mirato alla determinazione dello stato di nucleazione cellulare conseguente a trattamento con citocalasina D, su cellule derivate da topi knock-out (geneticamente nulli) per una delle



funzioni di maggior rilevo: quella del gene Rb (retinoblastoma), o del gene p21 o del gene p53. In queste cellule infatti la funzione che è stata resa knock-out non esiste, per cui il dato ottenuto può essere riferito alla perdita di tale funzione.

Il risultato mostra che, mentre le cellule knock-out per Rb e le cellule knock-out per p21 rimangono allo stato di cellule binucleate, le cellule knock-out per p53 danno luogo a multinucleazione.

Come ulteriore controllo della reale implicazione di p53 nel controllo della nucleazione sono state utilizzate nello stesso tipo di saggio le cellule knock-out per p53 nelle quali è stata reinserita la funzione di p53 (si è scelto di utilizzare una forma temperatura sensibile per escludere possibili errori derivanti da variazioni della popolazione cellulare non correlabili con il gene p53).

Tale risultato prova che i geni Rb e p21 quantunque implicati nei meccanismi che determinano la endoreduplicazione del DNA, sono comunque estranei alla determinazione della multinucleazione conseguente alla somministrazione di sostanze come la citocalasina D che è un inibitore dell'anello contrattile, e quindi della citodieresi. La sola mutazione nella funzione di p53 si è rivelata essere invece necessaria e sufficiente per la instaurazione di tale "status differenziale" tra cellule tumorali e cellule normali proliferanti (vedi esempio 11).

Nell'ottica del maggior rigore sperimentale essendo tali risultati ricavati su un sistema di cellule murine, il passo successivo è stato quello di ottenere una conferma di tali dati anche in linee cellulari umane, per verificare se la validità di tale osservazione potesse essere estesa al sistema di maggiore

interesse che è l'uomo. La linea cellulare considerata è stata quella di fibroblasti umani di polmone (LHF), trasformati mediante trasfezione con due oncogeni del papilloma virus (E6 ed E7) (vedi esempio 12). Questi due oncogeni virali hanno l'importante caratteristica funzionale di essere in grado di legarsi ed inattivare funzionalmente rispettivamente i prodotti dei geni p53 ed pRb.

La serie di esperimenti descritti nell'esempio 12 ha confermato anche per le linee cellulari umane la validità del dato ricavato sulle cellule murine, ed in conseguenza che la perdita del check-point della citodieresi, controllato da p53, ed identificato per la prima volta nel corso delle ricerche che hanno portato alla presente invenzione, può considerarsi alla base del fenomeno di multinucleazione in seguito a somministrazione di composti di classe A nelle cellule tumorali di entrambi i sistemi.

In conclusione quindi, condizione necessaria e sufficiente affinché l'uso combinato e il metodo di cui alla presente invenzione siano applicabili ad una cellule tumorale è che essa presenti la funzione di p53 inattiva, condizione che si registra per la maggior parte delle forme tumorali conosciute.

Addirittura la maggior parte di essi non solo presenta, ma si caratterizza per la funzione di p53 inattiva. Ad esempio per i carcinomi della mammella la presenza o assenza di p53 funzionale è uno degli indici prognostici. In tal senso anche per forme tumorali sconosciute o per cui comunque questo dato non è conosciuto esso può essere facilmente ricavato in seguito ad esempio a biopsia. Una eventuale assenza della inattivazione della funzione di p53 esclude a priori la praticabilità del metodo.

Qualsiasi forma tumorale che presentasse tale funzione intatta non potrebbe infatti dare luogo alla instaurazione dello status di binucleazione/multinucleazione per le cellule normali/tumorali rispettivamente e per cui il metodo di cui alla presente invenzione ed ogni e qualsiasi ulteriore metodo elaborato sulla base di esso, non sarebbero applicabili con successo.

Si è data finora della presente invenzione una descrizione di carattere generale. Con l'aiuto dei seguenti esempi verrà ora fornita una descrizione più dettagliata di sue specifiche forme di realizzazione, finalizzate a farne meglio comprendere scopi, caratteristiche, vantaggi e modalità operative.

ESEMPI.

Esempio 1: saggio di funzionamento del sistema.

Al fine di verificare il funzionamento del sistema, sono stati eseguiti una serie di esperimenti di formazione di colonie il cui risultato è sintetizzato nella seguente tabella 1. Il blocco della sintesi di DNA è stato rilevato mediante incorporazione di Bromodesossiuridina BrdU

Tabella 1

	#nuclei	BrdU ⁺	% S	% 1N	% 2N	% 3/4N	% >4N
1 C3H(BrdU 0h-24h)	180	174	97	98	1	1	0
2 v-src/v-myc(BrdU 0h-24h)	198	197	99	97	1	1	1
3 C3H(Cyto 0h-48h+ BrdU 24h-48h)	160	36	23	27	67	6	0
4 v-src/v-myc(Cyto 0h-48h + BrdU 24h-48h)	140	123	88	17	35	25	22
5 C3H(Cyto 0h-48h + BrdU 72h-96h)	180	173	96	92	6	2	1

La colonna 1 mostra la indicazione delle cellule utilizzate (C3H e/o C3H v-src/v-myc), e per ciascuna di esse il composto somministrato (CD e/o BrdU) ed il relativo tempo di somministrazione in ore.

Le colonne 2, 3 e 4 mostrano rispettivamente il numero assoluto dei nuclei analizzati, il numero dei nuclei che hanno incorporato la BrdU (e quindi hanno effettuato sintesi di

DNA nell'intervallo di tempo), e la percentuale di cellule che hanno effettuato sintesi di DNA nell'intervallo di tempo (direttamente derivata dalle precedenti due colonne).

La colonne 5, 6, 7 e 8 indicano la percentuale di cellule che alla fine del trattamento si mostrano mononucleate (5), binucleate (6), tri/tetranucleate (7) o con un numero di nuclei superiore a 4 (8), rispettivamente.

La riga 1 mostra il risultato del saggio per i vari parametri eseguito su cellule C3H in seguito alla somministrazione di BrdU dal tempo T0 al tempo T24 (questo dato di controllo caratterizza lo stato di proliferazione delle cellule durante l'intervallo di tempo del trattamento farmacologico);

La riga 2 il risultato del saggio per i vari parametri eseguito su cellule C3H *v-src/v-myc* in seguito alla somministrazione di BrdU dal tempo T0 al tempo T24;

La riga 3 il risultato del saggio per i vari parametri eseguito su cellule C3H in seguito alla somministrazione di CD dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48;

La riga 4 il risultato del saggio per i vari parametri eseguito su cellule C3H *v-src/v-myc* in seguito alla somministrazione CD dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48;

La riga 5 il risultato del saggio per i vari parametri eseguito su cellule C3H in seguito alla somministrazione di CD dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T72 al tempo T96 (questo dato caratterizza la reversibilità del trattamento con CD sulle cellule normali).

Il tempo risulta misurato in ore.

In particolare, le cellule di ciascuna coltura sono state piastrate in piastra da 35mm di diametro e ad una densità di 5×10^4 cellule/piastra, nelle seguenti condizioni standard: le cellule sono state cresciute adese ad un substrato di plastica (Falcon-BD), in un mezzo di coltura composto da Dulbecco's modified Eagle's Medium supplementato con L-glutamina 2mM, antibiotici, siero fetale bovino 10%, ad una temperatura di 37°C con una percentuale di CO₂ pari al 5% ed una umidità del 90%. Dopo circa 12 ore è stata aggiunto:

- per gli esperimenti di cui alle righe 1 e 2 (effettuati su cellule C3H e C3H *v-src/v-myc* rispettivamente) il solo solvente della citocalasina D dimetilsulfossido (DMSO) e BrdU per 24 ore (T0-T24) per controllare lo stato proliferativo delle cellule;
- per gli esperimenti di cui alle righe 3 e 4 (effettuati su cellule C3H e C3H *v-src/v-myc* rispettivamente) la CD per un periodo di 48 ore (T0-T48), laddove nelle ultime 24 ore di trattamento (T24-48) è stata aggiunta anche



la BrdU per controllare la percentuale di cellule capaci di entrare in fase S;

- per l'esperimento di cui alla riga 5 (effettuato su cellule C3H) Citocalasina D per un periodo di 48 ore (T0-T48) seguito da un intervallo di 24 ore, per permettere l'eliminazione del farmaco, e poi dall'aggiunta di BrdU per ulteriori 24 ore (T72-T96).

Le concentrazioni utilizzate sono state CD: 400 nM; BrdU: 20 μ M. DMSO: 0,11% Al termine del trattamento le cellule sono state processate ed analizzate come descritto in referenza 19

La somministrazione è stata eseguita sulle cellule rigorosamente proliferanti.

La scelta di misurare anche la incorporazione di BrdU e la percentuale di cellule che entrano in fase S, in aggiunta alla osservazione sullo stato di nucleazione, è stato dettato da esigenze di rigore sperimentale. Infatti il dato sulla nucleazione non può essere definitivo nell'ottica di uno schema sperimentale rigoroso perché lo status di binucleazione delle cellule normali è significativo nel senso della protezione solo se accompagnato da assenza della replicazione del DNA. In tal senso la misurazione del %S ha avuto la funzione di costituire una ulteriore conferma che non vi sia una distorsione del dato dovuto a cellule normali binucleate che replicano il DNA.

I risultati degli esperimenti riportati nelle righe 3 e 4, in particolare nella colonna 4 confermano che in seguito al trattamento delle cellule normali con la citocalasina D, si ottiene una bassa percentuale di cellule che entrano in fase S (23%), mentre in seguito allo stesso trattamento sulle cellule trasformate la percentuale di cellule che entrano in fase S è elevata (88%).

Tale dato trova piena corrispondenza nei rapporti tra le percentuali di ingresso in S dei due tipi cellulari trattati con la CD o con il solo vettore, rispettivamente per le normali e le trasformate 1:4 (97:23) e 1:1,1 (99:88) Questa indicazione viene confermata dai dati relativi alla binucleazione/multinucleazione riportato nelle altre colonne (98% e 97% di cellule mononucleate per le cellule controllo, contro il 67% di cellule normali binucleate ed il 45% di cellule trasformate che si presentano tri-tetranucleate o addirittura con più di quattro nuclei in seguito al trattamento). In tal senso la presenza anche per le cellule normali di una percentuale dell'1% o del 6% di cellule multinucleate è del tutto accettabile trattandosi di cellule in coltura.

Oltre alle indicazioni sopra riportate, una altra indicazione estremamente rilevante emerge dagli esperimenti effettuati: la reversibilità dell'azione della CD. In seguito infatti al trattamento delle cellule normali secondo le modalità riportate nella riga 5 della tabella, pari al tempo di somministrazione utilizzato nel saggio riportato nelle riga 3 (somministrazione di CD da T0 a T48, riposo da T48 a T72 misura di incorporazione di BrdU da T72 a T96) si osserva che alla fine ben il 92% delle cellule risulta mononucleato (contro il 98% delle cellule controllo). Inoltre ben il 96% delle cellule che sono sulla piastra si dimostrano ancora in grado di incorporare BrdU contro il 97% delle cellule controllo. Questo dato dimostra la totale reversibilità dell'azione della citocalasina D sulle cellule normali.

La validità di questa indicazione è rafforzata dalla combinazione del dato relativo alla nucleazione con quello relativo alla incorporazione del BrdU e della percentuale di cellule che entrano in fase S in seguito alla cessazione del

trattamento. Tale dato troverà ulteriori conferme nella sperimentazione successiva.

Esempio 2: verifica della intervenuta protezione sulle cellule normali in seguito ad uso combinato di CD e 3FT. Verifica qualitativa

Al fine di dimostrare la validità del trattamento combinato di CD e 3FT da un punto di vista farmacologico, sono stati condotti una serie di esperimenti per la misurazione della formazione di foci di trasformazione in coltura mista di cellule normali e tumorali.

I risultati sono sintetizzati nella tabella 2 nelle sue parti A e B.

TABELLA 2A

Cellule	- / -	CD / -	- / 3FT	CD / 3FT
1 C3H10T1/2 / -	Confluente	Confluente	0	Confluente
2 - / C3H10T1/2 v-src/v-myc	100	51	0	0
3 C3H10T1/2 / C3H10T1/2 v-src/v-myc	Confluente	Confluente	0	Confluente
	100	60	0	0

La colonna 1 mostra i tipi cellulari piastrati (C3H10T1/2; C3H10T1/2v-src/v-myc);

La colonna 2 mostra il risultato in seguito a trattamento con i soli veicoli (DMSO per la CD e H2O per la 3FT);

La colonna 3 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola CD per un periodo di 84 ore;

La colonna 4 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola 3FT per un periodo di 48 ore;

La colonna 5 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato secondo lo schema riportato in figura 1.

La riga 1 mostra l'esito del saggio condotto su cellule C3H10T1/2;

La riga 2 mostra l'esito del saggio condotto su C3H10T1/2v-src/v-myc

La riga 3 mostra l'esito del saggio condotto su un coltura mista di C3H10T1/2 e C3H10T1/2 v-src/v-myc

Le cellule sono state piastrate in piastre da 60 mm, alle seguenti densità:

- C3H10T1/2 (cellule normali) 10^4 cellule per piastra
- C3H10T1/2v-src/v-myc (cellule tumorali) 5×10^2 cellule per piastra

Le condizioni di coltura sono quelle definite come standard nell'esempio 1.

Dopo circa dodici ore le cellule sono state sottoposte a trattamento farmacologico il quale è consistito:

- per gli esperimenti riportati nella riga 1 (condotti su una coltura di sole cellule C3H10T1/2):

1. nella somministrazione di DMSO(0,11%) e di H₂O da T0 a T84 (vedi colonna 2);

2. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 (vedi colonna 3)

3. nella somministrazione di 3FT 40 μM da T24 a T72 (vedi colonna 4)

4. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 laddove a daT24 a T72 si è provveduto a somministrare 3FT 40 μM;

- per gli esperimenti riportati nella riga 2 (condotti su una coltura di sole cellule C3H10T1/2v-src/v-myc):

1. nella somministrazione di DMSO (0.11%) e di H₂O da T0 a T84 (vedi colonna 2);

2. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 (vedi colonna 3)

3. nella somministrazione di 3FT 40 μM da T24 a T72 (vedi colonna 4)

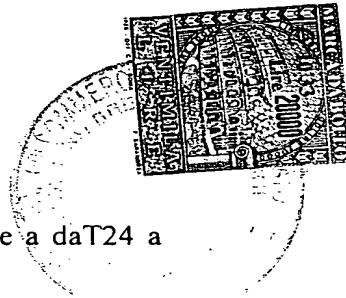
4. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 laddove a daT24 a T72 si è provveduto a somministrare 3FT 40 μM;

- per gli esperimenti riportati nella riga 3 (condotto su una coltura mista di cellule C3H10T1/2 e C3H10T1/2v-src/v-myc):

1. nella somministrazione di DMSO (0,11%) ed H₂O da T0 a T84 (vedi colonna 2);

2. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 (vedi colonna 3)

3. nella somministrazione di 3FT 40 μM da T24 a T72 (vedi colonna 4)



4. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 laddove a da T24 a T72 si è provveduto a somministrare 3FT 40 μ M.

Al termine del trattamento le cellule sono state tenute in coltura per il tempo necessario alla formazione dei foci, ovviamente i singoli gruppi sperimentali – ad es. le non trattate (- / -) piuttosto che le trattate solo con CD (CD / -) –

sono stati esaminati allo stesso tempo. Le cellule come descritto precedentemente (19) sono state lavate 2 volte con PBS e fissate 2x con 5% acido tricloroacetico a 4°C per 15 minuti, lavate 2 volte con Etanolo al 70% e colorate con una soluzione di Gimsa al 20% per 30 minuti al fine di evidenziare chiaramente i foci di trasformazione lasciando visibile il monostrato di cellule normali.

I valori, espressi come percentuali rispetto al non trattato, identificano il numero di foci di trasformazione rilevati al termine dell'esperimento. La definizione confluente si riferisce al monostrato di cellule normali presente all'interno della piastra (in grigio).

Ogni valore percentuale è stato calcolato sul dato medio rilevato in due piastre gemelle.

La opportunità di eseguire questi esperimenti utilizzando una differente quantità di cellule normali e tumorali piastrate, è funzionale non solo alla ricostruzione di una situazione quanto più vicina possibile ad uno stato di patologia neoplastica (nel quale la parte tumorale è numericamente minore), ma si rende necessaria per la natura del saggio stesso, al termine del quale le aree di trasformazione dovute alla crescita incontrollata delle cellule tumorali devono essere discrete e quantizzabili.

Il tempo iniziale di circa dodici ore indicato in questi ed anche negli altri esperimenti è il tempo necessario per consentire alle cellule normali di trovarsi ad una densità tale da permetterne la proliferazione e da garantire così una elevatissima affidabilità del risultato, che altrimenti potrebbe essere falsato da cellule che smettono di proliferare per motivi indipendenti dalla somministrazione dei farmaci da noi utilizzati.

Lo stesso esperimento è stato eseguito per conferma su un sistema comprendente le cellule C3H10T1/2 e le cellule L come controparte tumorale. Le condizioni e le modalità di esecuzione dell'esperimento sono le stesse dell'esperimento i cui risultati sono riportati in tabella 2A, salvo naturalmente che al posto delle C3H10T1/2v-src/v-myc sono state utilizzate quale controparte tumorale nel sistema le cellule L (cellule tumorali murine) piastrate ad una densità di 5×10^2 cellule per piastra.

I risultati sono schematizzati nella seguente tabella 2B

TABELLA 2 B

	Cellule	- / -	CD / -	- / 3FT	CD / 3FT
1	C3H10T1/2 /	Confluente	Confluente	0	Confluente
2	- / - cellule L	100	57	0	0
3	C3H10T1/2 / Cellule L	Confluente 100	Confluente 75	0 0	Confluente 0

La colonna 1 mostra i tipi cellulari piastrati (C3H10T1/2; Cellule L);

La colonna 2 mostra il risultato in seguito a trattamento con i soli veicoli (DMSO per la CD e H₂O per la 3FT);

La colonna 3 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola CD per un periodo di 84 ore;

La colonna 4 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola 3FT per un periodo di 48 ore;

La colonna 5 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato secondo lo schema riportato in figura 1.

La riga 1 mostra l'esito del saggio condotto su cellule C3H10T1/2;

La riga 2 mostra l'esito del saggio condotto su cellule L

La riga 3 mostra l'esito del saggio condotto su una coltura mista di cellule C3H10T1/2 e cellule L.

In esito all'analisi comparativa dei risultati ottenuti è stato possibile osservare quanto segue. In assenza di qualsivoglia trattamento, in entrambi i sistemi, le cellule normali divengono confluenti dando luogo ad un monostrato, mentre le tumorali danno luogo ad un certo numero di foci. Nella tabella è stato considerato il valore 100, come riferimento. (vedi colonna 2 di entrambe le tavette).

Somministrando invece il solo farmaco di classe A, Citocalasina D per tutta la normale durata del trattamento (24 ore di pretrattamento più 48 ore di trattamento combinato più 12 ore di spурго per un totale di 84 ore) alla fine del trattamento si registra solo una leggera diminuzione nel valore relativo alle cellule tumorali rispetto al controllo (vedi colonna 3 di entrambe le tavette).

Tale flessione si registra ovviamente sia nella coltura costituita dalle sole cellule tumorali che nella coltura mista e risulta pienamente giustificata dalla avvenuta instaurazione dello status di cellule multinucleata in seguito al trattamento con Citocalasina D, il quale comporta anche una maggiore difficoltà per le cellule, in seguito alla cessazione del trattamento, nella ripresa della normale proliferazione cellulare.

In seguito al trattamento con il solo farmaco di classe B 3FT, si registra ovviamente la totale assenza di crescita di entrambi i tipi cellulari (vedi colonna 4 di entrambe le tavette).

In conseguenza invece della applicazione al sistema del metodo come descritto nella figura 1 (24 ore di pretrattamento con farmaco di classe A, 48 ore di trattamento combinato, 12 ore di spурго) in seguito ad una fase di ripresa della proliferazione cellulare di 7 giorni, si può osservare che mentre

le cellule normali sono state protette tanto da dare luogo ad un monostrato di cellule confluenti, le cellule tumorali sono state completamente eradicate sia dalla cultura cellulare costituita dalle sole C3H *v-src/v-myc* che dalle cellule in coltura mista (vedi colonna 5).

Esempio 3: verifica della intervenuta protezione sulle cellule normali in seguito ad uso combinato di CD e 3FT: quantificazione della protezione intervenuta sulle cellule normali rispetto alle cellule tumorali

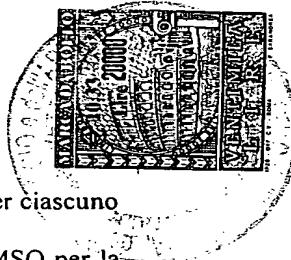
Al fine di ottenere indicazioni quantitative relativamente agli effetti del trattamento farmacologico descritto nello schema riportato in figura 1 e saggiato qualitativamente nella serie di esperimenti descritti nel precedente esempio 2, sono stati condotti una serie di esperimenti corrispondenti su cellule coltivate questa volta singolarmente ad una densità tale da consentire la formazione di colonie discrete contabili.

Il risultati sono schematizzati nella seguente tabella 3.

TABELLA 3

		# cellule	- / -	CytoD / -	- / 3FT	Cyto/3FT
A	C3H10T1/2	a 1×10^3	76	49	0	19
		b 5×10^3	Confluenti	Confluenti	0	48
		c 1×10^4	Confluenti	Confluenti	0	Confluenti
B	C3H10T1/2(<i>v-src/myc</i>)	a 5×10^2	86	18	0	0
		b 1×10^3	Confluenti	35	0	0
		c 5×10^3	Confluenti	Confluenti	0	0
C	L cells	a 5×10^2	81	55	0	0
		b 1×10^3	Confluenti	Confluenti	0	0
		c 5×10^3	Confluenti	Confluenti	0	0

La colonna 1 mostra i tipi cellulari piastrati (C3H10T1/2; C3H10T1/2/*v-src v-myc*; L cells);



La colonna 2 mostra le densità clonali utilizzate nel condurre gli esperimenti per ciascuno dei tipi cellulari;

La colonna 3 mostra il risultato in seguito a trattamento con i soli veicoli (DMSO per la CD e H₂O per la 3FT);

La colonna 4 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola CD per un periodo di 84 ore;

La colonna 5 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola 3FT per un periodo di 48 ore;

La colonna 6 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato secondo lo schema riportato in figura 1.

La parte A mostra l'esito del saggio condotto su cellule C3H10T1/2, piastrate a diverse densità: in particolare: 1×10^3 (a); 5×10^3 (b) 1×10^4 (c);

La parte B mostra l'esito del saggio condotto su C3H10T1/2/v-src/v-myc, piastrate a diverse densità, in particolare: 1×10^4 (a); 5×10^2 (b); 5×10^3 (c);

La parte C mostra l'esito del saggio condotto su cellule L piastrate a diverse densità, in particolare: 5×10^2 (a); 1×10^3 (b); 5×10^3 (c).

In particolare sia le condizioni di coltura che le concentrazioni di farmaci utilizzate, nonché le modalità del trattamento sono le stesse descritte nell'esempio 2. In particolare il trattamento farmacologico è consistito:

- per gli esperimenti riportati nella parte A (condotti su una coltura di sole cellule C3H10T1/2) per ciascuna della densità clonali indicate nelle righe a., b., e c.:

1. nella somministrazione di DMSO (0,11%) e H₂O da T0 a T84 (vedi colonna 3);
2. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 (vedi colonna 4)
3. nella somministrazione di 3FT 40 μ M da T24 a T72 (vedi colonna 5)
4. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 laddove a da T24 a T72 si è provveduto a somministrare 3FT 40 μ M (vedi colonna 6);

- per gli esperimenti riportati nella parte B (condotti su una coltura di sole cellule C3H10T1/2v-src/v-myc) per ciascuna della densità clonali indicate nelle righe a., b. e c.:

1. nella somministrazione di DMSO (0,11%) e H₂O da T0 a T84 (vedi colonna 3);

2. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 (vedi colonna 4)
3. nella somministrazione di 3FT 40 μ M da T24 a T72 (vedi colonna 5)
4. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 laddove a daT24 a T72
si è provveduto a somministrare 3FT 40 μ M (vedi colonna 6);
- per gli esperimenti riportati nella parte C della tabella (condotti su una
coltura di sole cellule L) per ciascuna della densità clonali indicate nelle
righe a., b. e c.:
 1. nella somministrazione di 0,11% DMSO ed H₂O da T0 a T84(vedi colonna 3);
 2. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 (vedi colonna 4)
 3. nella somministrazione di 3FT 40 μ M da T24 a T72 (vedi colonna 5)
 4. nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 laddove a daT24 a T72
si è provveduto a somministrare 3FT 40 μ M (vedi colonna 6).

Dopo il rilascio farmacologico le cellule sono state lavate 2 volte con PBS e lasciate in coltura per un tempo necessario alla formazione di colonie discrete (come per l'esperimento descritto nell'esempio 2 i singoli gruppi sperimentali sono stati fissati allo stesso tempo) al termine del quale le cellule sono state processate come descritto nell'esempio 2.

I valori riscontrabili riportati in tabella, indicano il numero assoluto di colonie presenti all'interno della singola piastra; il termine "confluenti" descrive una situazione in cui non è possibile contare le colonie. Come per l'esperimento descritto nell'esempio 2 i singoli valori sono la media di due piastre gemelle.

Si è in questo modo osservato che lasciando proliferare le cellule per un tempo pari alla durata complessiva del trattamento combinato secondo lo schema descritto in figura 1, (84 ore) somministrando solo DMSO ed H₂O ,

si ottengono in ogni caso cellule confluenti per le due densità clonali di partenza maggiori mentre per la coltura a densità clonale minore si ottengono singole colonie per le cellule normali e tumorali rispettivamente (vedi colonna 3 che riporta il dato dei controlli).

Per quanto riguarda invece i risultati dei trattamenti effettuati con il solo farmaco di classe A (vedi colonna 4), con il solo farmaco di classe B (vedi colonna 5), e il risultato del trattamento combinato (vedi colonna 6) è possibile osservare che:

- alla densità di base (1×10^3) per le C3H10T1/2 in assenza di trattamento si osserva il valore 76 (indicativo anche del potenziale clonogenico), in seguito a trattamento con il composto di classe A Citocalasina D si osserva il valore 49 (indicativo di un certo effetto tossico), in seguito a trattamento con il solo farmaco di classe B 3FT, come atteso, si osserva il valore 0, e, in seguito a trattamento combinato si osserva il valore 19 (dato indicativo della intervenuta protezione);

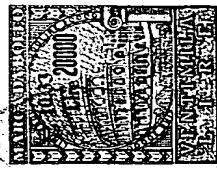
- alla stessa densità di base (5×10^2) per le C3H10T1/2 *v-src/v-myc* in assenza di trattamento si osserva invece un valore, 86 (sempre indicativo anche del potenziale clonogenico), in seguito a trattamento con farmaco di classe A CD si osserva il valore 18 (indicativo della presenza di una maggiore effetto tossico della CD sulle cellule tumorali rispetto a quello registrato per le cellule normali), in seguito a trattamento con il solo composto di classe B 3FT si osserva il valore 0 (come atteso), e in seguito a trattamento combinato si osserva il valore 0 (dato indicativo della assenza di un qualsiasi effetto protettivo in esito alla applicazione del metodo di cui alla presente invenzione sulle cellule tumorali);

- alla stessa densità di base (5×10^2) per le cellule L si osserva il valore 81 in assenza di trattamento (dato indicativo anche del potenziale clonogenico), il valore 55 in seguito a trattamento con farmaco di classe A CD (indicativo di un effetto tossico da parte della citocalasina D minore rispetto a quello registrato per altre cellule tumorali C3H10T1/2 *v-src/v-myc*), in seguito a trattamento con il solo farmaco di classe B 3FT (risultato atteso) e 0 in seguito a trattamento combinato (dato indicativo anche su queste cellule della assenza di un qualsiasi effetto protettivo in esito alla applicazione del metodo di cui alla presente invenzione sulle cellule tumorali);

Tali dati risultano confermati e validati anche dalle misurazioni effettuate con densità di partenza molto più elevate (vedi dati relativi alle due densità clonali maggiori), in quanto, significativamente, il numero di foci per le cellule tumorali in seguito a trattamento combinato, anche partendo da un valore più elevato di cellule di partenza, è sempre 0.

In base al confronto di tali valori ottenuti separatamente sui diversi sistemi in esito alla misurazione quantitativa, è stato quindi possibile valutare l'indice di selettività del farmaco di classe B, che se usato da solo, risulta ugualmente letale sia per le cellule normali che quelle tumorali, mentre in combinazione con il farmaco di classe A secondo il protocollo qui descritto risulta essere almeno 500-1000 volte più efficace nell'uccidere le cellule tumorali.

Esempio 4: verifica della capacità del farmaco di classe A citocalasina D, di non interferire con i meccanismi di trasporto del farmaco di classe B 3FT: saggio di formazione di colonie.



Al fine di verificare la assenza di interferenze tra il meccanismo di azione dei farmaci di classe A ed in particolare del farmaco di classe A citocalasina D, sono stati condotti una serie di esperimenti i cui risultati sono schematizzati nella seguente tabella 4.

TABELLA 4

Trattamento	Colonie	Dev. St.
1 - / -	111	3
2 CitoD / -	46	2
3 CitoB / -	41	1,5
4 CitoD / 3FT	3	0,5
5 CitoB / 3FT	19	1
6 - / 3FT	2	0,5

La colonna 1 mostra i diversi trattamenti effettuati sulle cellule C3H10T1/2 *v-src/v-myc*;

La colonna 2 mostra il risultato in seguito a ciascun trattamento

La colonna 3 mostra la deviazione standard

La riga 1 mostra il risultato del trattamento con i soli veicoli DMSO e H₂O (controllo);

La riga 2 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola CD per un periodo di 84 ore;

La riga 3 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola CB per un periodo di 84 ore;

La riga 4 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato secondo lo schema riportato in figura 1 utilizzando CD e 3FT;

La riga 5 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato secondo lo schema riportato in figura 1 utilizzando CB e 3FT;

La riga 6 mostra il risultato in seguito a trattamento con sola 3FT.

In particolare sono stati effettuati una serie di saggi di formazione di colonie, sulle sole cellule C3H10T1/2(*v-src/v-myc*), coltivate ad una densità clonale di 5×10² cell/60mm, su piastre di 60 mm. Le condizioni di coltura sono quelle descritte nell'esempio 2.

Le cellule sono state piastrate e dopo dodici ore si è provveduto al trattamento farmacologico che è consistito in:

- per gli esperimenti riportati nella riga 1 nella somministrazione di DMSO (0,11%) e H₂O da T0 a T84 (vedi colonna 3);
- per gli esperimenti riportati nella riga 2 nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84

- per gli esperimenti riportati nella riga 3 nella somministrazione di CB 3 μM da T0 a T84
- per gli esperimenti riportati nella riga 4 nella somministrazione di CD 400 nM da T0 a T84 laddove da T24 a T72 si è provveduto a somministrare 3FT 30 μM
- per gli esperimenti riportati nella riga 5 nella somministrazione di CB 3 μM da T0 a T84 laddove da T24 a T72 si è provveduto a somministrare 3FT 30 μM ;
- per gli esperimenti riportati nella riga 6 nella somministrazione di 3FT 30 μM da T24 a T72.

Dopo il rilascio farmacologico le cellule sono state trattate come descritto nell'esempio 2.

Questi esperimenti sono stati ovviamente eseguiti sulle sole cellule tumorali in quanto la assenza di interferenza sul meccanismo di trasporto dei composti di classe B rileva naturalmente sulle sole cellule tumorali che devono essere soggette alla azione chemioterapica eradicativa. Sono stati condotti una serie di esperimenti in cui si è somministrato separatamente alle cellule sia la citocalasina D che la Citocalasina B (CB) (composto noto per la sua capacità di interferire con il meccanismo di trasporto di antimetaboliti).

Il risultato indica che in seguito al trattamento con sola CD o CB abbiamo 41 e 46 colonie rispettivamente contro le 111 del controllo, e 2 sole colonie nel trattamento con sola trifluorotimidina (i valori indicati sono numeri assoluti ricavati in base alla media di più esperimenti). Quando si effettua il trattamento combinato (vedi righe 4 e 5) si osserva un valore di 3 per la CD contro un valore di 19 per la CB, indicativi di una eradicazione quasi totale

nel primo caso ed una eradicazione parziale in seguito all'effetto protettivo nel secondo caso.

Tale risultato conferma la inclusione nella classe A della citocalasina D e la esclusione della Citocalasina B.

Esempio 5: definizione della classe A: estensione della validità del metodo ad altri farmaci di classe A

Per verificare la appartenenza di altri composti alla classe A come definita, sono stati condotti una serie di esperimenti di formazione di colonie secondo lo stesso schema sperimentale utilizzato nella serie di esperimenti descritti nell'esempio 1, alle stesse condizioni di coltura standard e con gli stessi tempi di somministrazione, con la unica differenza che al posto della CD sono stati usati Latrunculina, oppure Jasplakinolide oppure Condramide B.

I risultati sono riportati nella seguente tabella 5, per brevità solo i dati riguardanti lo stato di nucleazione.

TABELLA 5

		% 1N	% 2N	% 3/4N	% >4N
A	Latrunculina a	C3H10T1/2	23	75	2
	B (650nM) b	C3H10T1/2(<i>v-src/v-myc</i>)	4	25	54
B	Jasplakinoli de (700nM) a	C3H10T1/2	44	51	4
	b	C3H10T1/2(<i>v-src/v-myc</i>)	84	9	4
C	Condramide a (100nM)	C3H10T1/2	32	64	3
	b	C3H10T1/2(<i>v-src/v-myc</i>)	88	4	5

La colonna 1 mostra i potenziali composti di classe A somministrati (Latrunculina, Jasplakinolide e Condramide B) e le relative concentrazioni

La colonna 2 mostra i tipi cellulari piastrati (C3H10T1/2; C3H10T1/2*v-src-myc*);

La colonne 3, 4, 5 e 6 indicano la percentuale di cellule che alla fine del trattamento si mostrano mononucleate (3), binucleate (4), tri/tetranucleate (5) o con un numero di nuclei superiore a quattro (6), rispettivamente.

La parte A mostra l'esito del saggio effettuato in seguito a somministrazione di latrunculina dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48, su cellule C3H10T1/2 (a) e cellule C3H10T1/2*v-src-myc* (b);

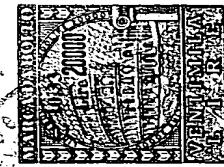
La parte B mostra l'esito del saggio effettuato in seguito a somministrazione di jasplakinolide dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48, su cellule C3H10T1/2 (a) e cellule C3H10T1/2v-src-myc (b);

La parte C mostra l'esito del saggio effettuato in seguito a somministrazione di condramide dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48, su cellule C3H10T1/2 (a) e cellule C3H10T1/2v-src-myc (b);

In particolare, i dati riportati in tabella sono stati ricavati in seguito a somministrazione in condizioni standard come definite nell'esempio 1 di:

- per gli esperimenti di cui alle parte A (effettuati su cellule C3H10T1/2 (a) e C3H10T1/2v-src/v-myc (b)) latrunculina 650 nM per un periodo di 48 ore (T0-T48), laddove nelle ultime 24 ore di trattamento (T24-48) è stata aggiunta anche la BrdU per controllare la percentuale di cellule capaci di entrare in fase S;
- per gli esperimenti di cui alla parte B (effettuati su cellule C3H10T1/2 (a) e C3H10T1/2v-src/v-myc (b)) Jasplakinolide 700 nM per un periodo di 48 ore (T0-T48), laddove nelle ultime 24 ore di trattamento (T24-48) è stata aggiunta anche la BrdU per controllare la percentuale di cellule capaci di entrare in fase S;
- per gli esperimenti di cui alle parte C (effettuati su cellule C3H10T1/2 (a) e C3H10T1/2v-src/v-myc (b)) condramide 100 nM per un periodo di 48 ore (T0-T48), laddove nelle ultime 24 ore di trattamento (T24-48) è stata aggiunta anche la BrdU per controllare la percentuale di cellule capaci di entrare in fase S.

La parte del grafico relativa alla misurazione dei valori BrdU e %S non è qui riportata in quanto non essenziale per l'analisi del risultato, così come i controlli che sono stati comunque effettuati in accordo con lo schema sperimentale descritto nell'esempio 1.



I risultati ottenuti confermano come sia la jasplakinolide che la condramide che la latrunculina siano pienamente capaci di interferire con la formazione dell'anello contrattile delle cellule normali che rimangono in gran parte allo stadio di binucleate (vedi tabella). Sulle cellule trasformate invece queste sostanze interferiscono con la polimerizzazione del citoscheletro di actina ma la loro azione è talmente reversibile che la inibizione sulla citodieresi non è evidente.

La azione di tali sostanze si è dimostrata infatti altamente reversibile anche sulle cellule normali (dati non riportati). In tal senso latrunculina, jasplakinolide e condramide si sono dimostrati farmaci di classe A per quanto riguarda la capacità di instaurare lo "status differenziale" in cellule normali e tumorali che consente l'applicazione del metodo.

Esempio 6: definizione della classe A: verifica della capacità dei composti candidati di inibire il trasporto dei composti di classe B nelle cellule tumorali

Al fine di accettare se i composti candidati risultati positivi negli esperimenti precedenti potessero validamente considerarsi farmaci di classe A è stata saggidata la relativa capacità di interferire con il meccanismo di assunzione dei composti di classe B ed in particolare con la 3FT, su cellule tumorali (nel caso specifico le cellule tumorali C3H10T1/2v-src/v-myc). Questa interferenza è stata misurata utilizzando timidina triziata in considerazione del fatto che è ben noto allo stato della tecnica che in prima approssimazione i meccanismi di trasporto dei composti di classe B sono gli stessi dei nucleosidi. I risultati relativi sono stati riassunti nella seguente tabella 6.

TABELLA 6

Timidina(H ³)	Farmaco (nM)	CPM/µg prot.	Dev. St.
1 0	0	0,3	0
2 4µCi/ml	0	505	58
3 4µCi/ml	CytB (3000)	223	8
4 4µCi/ml	CytD (400)	391	5
5 4µCi/ml	LatrB (650)	283	4
6 4µCi/ml	Jaspl (700)	569	22
7 4µCi/ml	CondRB (100)	552	41

La colonna 1 mostra la quantità di Timidina (H³) somministrata alle cellule C3H10T1/2 *v-src/v-myc*;

La colonna 2 mostra i diversi farmaci somministrati (Citocalasina D Citocalasina B, latrunculina jasplakinolide condramide) e le relative concentrazioni.

La colonna 3 mostra i valori di emissione in cpm/µg di proteina;

La colonna 4 la deviazione standard del risultato;

La riga 1 mostra il controllo;

La riga 2 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola Timidina (H³);

La riga 3 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato di Timidina (H³) e CB;

La riga 4 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato di Timidina (H³) e CD;

La riga 5 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato di Timidina (H³) e Latrunculina B;

La riga 6 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato di Timidina (H³) e jasplakinolide;

La riga 7 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato di Timidina (H³) e Condramide;

L'esperimento è stato condotto sulle sole cellule tumorali in condizioni di coltura standard come definite nell'esempio 1. Le cellule sono state piastrate in piastra a 24 pozzetti ad una densità di 5×10^4 cellule/pozzetto in "condizioni standard". Dopo circa dodici ore, è stato eseguito il trattamento il quale è consistito:

- per l'esperimento riportato in riga 3, nella somministrazione di Citocalasina B, 3000 nM, per 24 ore;
- per l'esperimento riportato in riga 4, nella somministrazione di Citocalasina D, 400 nM, per 24 ore;
- per l'esperimento riportato in riga 5, nella somministrazione di Latrunculina 650 nM, per 24 ore;

- per l'esperimento riportato in riga 6, nella somministrazione di Jasplakinolide 700 nM, per 24 ore;
- per l'esperimento riportato in riga 7, nella somministrazione di Condramide 100 nM, per 24 ore;

Al termine del trattamento in presenza del farmaco è stata eseguita una incorporazione di timidina triziata $4\mu\text{Ci}/\text{ml}$ per 5 ore. Al termine le cellule sono state lavate 2 volte con PBS, estratte con 5% acido tricoloroacetico freddo e successivamente lisate con NaOH.

I vari campioni, una volta aggiunto liquido di scintillazione, sono stati letti in un contatore β counter. I valori di emissione, normalizzati per la quantità di proteine presente in ciascun campione (quantizzate mediante Lowry) sono espressi in valori di conte per minuto/microgrammi di proteine in colonna 3.

Come controlli sono stati considerati:

- una coltura di cellule C3H10T1/2v-src/v-myc lasciata proliferare per la durata complessiva dell'esperimento (12 ore + 24 ore + 5 ore) e successivamente sottoposta alla rilevazione della radioattività al β counter (vedi valori riportati nella riga 1)
- una coltura di cellule C3H10T1/2v-src-myc lasciata proliferare per le prime dodici ore iniziali e per la durata del trattamento farmacologico dell'esperimento (12 ore + 24 ore), soggetta successivamente ad incorporazione di timidina triziata $4\mu\text{Ci}/\text{ml}$ per 5 ore e successivamente sottoposta alla rilevazione al bcounter (vedi valori riportati nella riga 2);

L'analisi del risultato mostra che a conferma dell'esperimento descritto nell'esempio 8, la citocalasina B inibisce il trasporto (223 cpm/ μg contro 505

cpm/ μ g) e la citocalasina D sostanzialmente non lo inibisce (391 cpm/ μ g contro 505 cpm/ μ g). Per quanto riguarda gli altri composti testati, la jasplakinolide e la condramide non si dimostrano inibitori del trasporto con un valore di 559 cpm/ μ g e 562 cpm/ μ g rispettivamente contro le 505 cpm/ μ g del controllo, mentre la latrunculina B, pur avendo un valore di 283 cpm/ μ g, mostra una capacità di inibizione del trasporto di nucleosidi al di sotto della soglia stabilita del 50% (vedi descrizione dettagliata della invenzione).di inibizione, rientrando anch'essa nelle caratteristiche della classe A

Il risultato di tale saggio è stato infatti confermato dalla sottoposizione di tali composti ai saggi descritti nell'esempio 2 e 3 (i relativi risultati non sono qui riportati).

In tal senso, essendo la classe A una classe aperta, la positività a questo saggio, nonché a quello descritto nell'esempio 1 è indicativo dell'appartenenza di un farmaco candidato alla classe A di farmaci da utilizzare in combinazione con la classe B per la eradicazione completa e selettiva delle cellule tumorali da colture miste in vitro, in trattamenti in vivo o ex vivo.

Esempio 7: Definizione della classe B: verifica farmaci potenzialmente appartenenti alla classe B tramite l'applicazione del metodo

Al fine di verificare la appartenenza alla classe B di altri composti candidati gli esperimenti descritti nell'esempio 2 sono stati ripetuti utilizzando i composti 2-cloro-desossiadenosina (2ClAd) e citarabina (Ara C).

I risultati sono schematizzati nelle seguenti tabelle 7A e 7B corrispondenti alla tabella 2a/b.

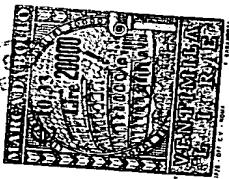


TABELLA 7A

Cellule	- / -	CD / -	- / 2ClAd	CD / 2ClAd
1 C3H10T1/2 / -	Confluenti	Confluenti	0	*
2 - / C3H10T1/2 <i>v-src/v-myc</i>	100	24	0	0
3 C3H10T1/2 / C3H10T1/2 <i>v-src/v-myc</i>	Confluenti	Confluenti	0	*
	100	30	0	0

La colonna 1 mostra i tipi cellulari piastrati (C3H10T1/2; C3H10T1/2*v-src/v-myc*);

La colonna 2 mostra il risultato in seguito a trattamento con i soli veicoli (DMSO per la CD e H₂O per la 2ClAd);

La colonna 3 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola CD per un periodo di 84 ore;

La colonna 4 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola 2ClAd per un periodo di 48 ore;

La colonna 5 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato secondo lo schema riportato in figura 1.

La riga 1 mostra l'esito del saggio condotto su cellule C3H10T1/2;

La riga 2 mostra l'esito del saggio condotto su C3H10T1/2*v-src/v-myc*

La riga 3 mostra l'esito del saggio condotto su un coltura mista di C3H10T1/2 e C3H10T1/2 *v-src/v-myc*

* le cellule normali riescono a riformare il monostato in tempi più lunghi e ad una densità di saturazione più bassa; esse inoltre mostrano un aspetto decisamente senescente (vedi testo).

TABELLA 7B

Cellule	- / -	CD / -	- / AraC	CD / AraC
1 C3H10T1/2 / -	Confluenti	Confluenti	0	Confluenti
2 - / C3H10T1/2 <i>v-src/v-myc</i>	100	28	0	0
3 C3H10T1/2 / C3H10T1/2 <i>v-src/v-myc</i>	Confluenti	Confluenti	0	Confluenti
	100	40	0	0

La colonna 1 mostra i tipi cellulari piastrati (C3H10T1/2; C3H10T1/2 *v-src/v-myc*);

La colonna 2 mostra il risultato in seguito a trattamento con i soli veicoli (DMSO per la CD e H₂O per la 2ClAd);

La colonna 3 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola CD per un periodo di 84 ore;

La colonna 4 mostra il risultato in seguito a trattamento con la sola 2ClAd per un periodo di 48 ore;

La colonna 5 mostra il risultato in seguito a trattamento combinato secondo lo schema riportato in figura 1.

La riga 1 mostra l'esito del saggio condotto su cellule C3H10T1/2;

La riga 2 mostra l'esito del saggio condotto su C3H10T1/2 *v-src/v-myc*
La riga 3 mostra l'esito del saggio condotto su una coltura mista di cellule C3H10T1/2 ed
C3H10T1/2 *v-src/v-myc*.

L'esperimento di formazione di foci è stato quindi condotto in condizioni e
secondo modalità del tutto identiche a quelle descritte nell'esempio 2, con la
differenza che al posto della 3FT sono state somministrate 2CIAd 80 μ M per
la serie di saggi i cui risultati sono riportati nella tabella 7A, e Ara C 40 μ M
per la serie di saggi i cui risultati sono riportati nella tabella 7B.

Analogamente a tutti gli altri saggi in cui sono stati utilizzati composti di
classe B, le concentrazioni indicate sono preliminarmente quelle verificate
essere le minime necessarie ad uccidere tutte le cellule proliferanti nel tempo
del trattamento combinato funzione del ciclo cellulare delle cellule tumorali
utilizzate (in questo caso 48h).

In tutte e due i casi di trattamento combinato dei farmaci di classe A con
quelli di classe B (sia Ara C che 2CIAd) si osserva una drastica diminuzione
se non addirittura l'assenza delle colonie dei e foci di trasformazione e,
addirittura, una riformazione del monostrato di cellule normali (vedi tabelle
4A e B colonna 4). Ciò che rileva per la descrizione delle caratteristiche dei
farmaci della classe B è però il fatto che mentre il monostrato di cellule
trattate con il trattamento combinato eseguito utilizzando l'Ara C si riforma
normalmente, il monostrato di cellule riformatosi in seguito a trattamento con
la 2CIAd si riforma con un tempo pari al doppio degli altri due farmaci testati
(si passa dai 5gg del saggio condotto con Ara C e 3FT ai 10/12 gg del saggio
condotto con 2CIAd). Inoltre la densità di saturazione del monostrato
(numero di cellule per unità di superficie) riformatosi dopo il trattamento con
2CIAd è decisamente più bassa rispetto agli altri casi (di circa 1/3), e l'aspetto
delle cellule del monostrato è decisamente senescente.

Questi dati relativi al tempo della fase di ripresa della proliferazione e all'aspetto delle cellule normali alla fine del trattamento complessivo, sono indicativi dell'esistenza di un certo effetto tossico della 2CIAd non solo sulle cellule tumorali ma anche sulle cellule normali in seguito al trattamento combinato.

Tale risultato ha reso necessaria una ulteriore verifica per la determinazione della tossicità della 2CIAd e di altri composti candidati sulle cellule normali, per la verifica della sussistenza in capo a tali composti del secondo requisito per la appartenenza alla classe B. In tal senso il saggio che segue deve considerarsi determinante in questo senso.

Esempio 8: Definizione della classe B: analisi della tossicità dei composti candidati sulle cellule arrestate.

A tal fine è stata eseguita una serie di saggi di riattivazione della sintesi di DNA in cellule C3H10T1/2 arrestate reversibilmente in G0/G1 mediante deprivazione dei fattori di crescita, in seguito al trattamento con vari potenziali farmaci di classe B. La scelta di operare sperimentalmente su cellule arrestate per deprivazione dei fattori di crescita, e subconfluenza, e non su cellule trattate con citocalasina D o altri farmaci di classe A è stata fatta per comodità sperimentale dato che è stato osservato che in seguito a trattamento con citocalasina D si ha un arresto di cellule normali allo stadio di binucleate in G0/G1. Tra i composti candidati sono stati inclusi oltre la 3FT e la 2 CIAd l'Ara C, la 6-tioguanina (6ThG) e la doxorubicina date le loro caratteristiche note in arte

I risultati sono schematizzati nella seguente tabella 8.

TABELLA 8

Farmaci	# nuclei	BrdU ⁺	% in fase S	% cellule
1 0	207	111	54	100
2 3FT (40 μ M)	203	117	58	90
3 AraC (40 μ M)	216	116	54	87
4 2ClAd (80 μ M)	206	6	3	97
5 6ThG (100 μ M)	220	88	40	81
6 Doxo (1 μ g/ml)	12	0	0	3
7 EtBr (1 μ g/ml)	220	20	9	26

La colonna 1 mostra i differenti farmaci utilizzati nei vari saggi (3FT; Ara C; 2ClAd; 6ThG; Doxo; EtBr) e le relative concentrazioni;

La colonna 2 mostra il numero assoluto dei nuclei osservati;

La colonna 3 mostra il numero dei nuclei che hanno incorporato BrdU in esito al trattamento con i vari composti;

La colonna 4 mostra la percentuale di cellule che entrano in fase S (nell'intervallo di tempo) in esito al trattamento con i vari composti, estrapolato sulla base dei dati riportati nelle colonne 2 e 3;

La colonna 5 mostra la percentuale di cellule che sono rimaste adese alla fine del trattamento (riferito al controllo non trattato).

La riga 1 mostra l'esito del saggio condotto somministrando solo BrdU;

La riga 2 mostra l'esito del saggio condotto somministrando 3FT 40 μ M;

La riga 3 mostra l'esito del saggio condotto somministrando Ara C 40 μ M;

La riga 4 mostra l'esito del saggio condotto somministrando 2ClAd 80 μ M;

La riga 5 mostra l'esito del saggio condotto somministrando 6ThG 100 μ M;

La riga 6 mostra l'esito del saggio condotto somministrando Doxo 1 μ g/ml;

La riga 7 mostra l'esito del saggio condotto somministrando EtBr 1 μ M.

Le condizioni di coltura utilizzate sono quelle standard come definite nell'esempio 1. Il saggio è stato condotto secondo le seguenti modalità.

Le cellule sono state piastrate ad una densità di 10^5 per ciascuna piastra da 35mm. Dopo circa 12 ore sono state passate in terreno con bassi fattori di crescita (DMEM addizionato con l'1% di FCS) per provocare l'arresto della proliferazione. Dopo 48 ore, (in seguito alla instaurazione di una situazione del tutto corrispondente alla situazione a T24 secondo lo schema di trattamento riportato in figura 1 e descritta negli esempi 2 e 3), si è provveduto ad effettuare il trattamento farmacologico che è consistito:

- per il saggio riportato nella riga 2, nella somministrazione di 3FT 40 μ M, per 48 ore;



- per il saggio riportato nella riga 3, nella somministrazione di Ara C 40 μ M, per 48 ore;
- per il saggio riportato nella riga 4, nella somministrazione di 2ClAd 80 μ M, per 48 ore;
- per il saggio riportato nella riga 5, nella somministrazione di 6 tioguanina (6Thg) 100 μ M, per 48 ore;
- per il saggio riportato nella riga 6, nella somministrazione di Doxorubicina (Doxo) 1 μ g/ml, per 48 ore;
- per il saggio di controllo positivo riportato nella riga 7, nella somministrazione di Etidio Bromuro (EtBr) 1 μ M, per 48 ore.

per il saggio di controllo negativo riportato nella riga 1, nella somministrazione di BdRU per 48 ore, per la misurazione delle cellule che hanno continuato la proliferazione in assenza di trattamento. Il tempo del trattamento coincide con il tempo del trattamento combinato secondo lo schema riportato in figura 1, per le cellule C3H10T1/2.

Una volta effettuato il rilascio farmacologico, le cellule sono state lavate 2x e lasciate per altre 12 ore in basso siero così da permettere l'espulsione dei farmaci residui in condizioni di non proliferazione. Al termine delle 24 ore in basso siero alle cellule è stato aggiunto terreno di proliferazione (DMEM +10% FCS) addizionato con 20 μ M BrdU in modo da marcare le cellule che effettuano la sintesi di DNA. Successivamente ad una stimolazione di 24 ore le cellule sono state fissate e processate come descritto in Grossi et al. 1991 (19). La percentuale di cellule che hanno effettuato sintesi di DNA nelle 24 ore di marcatura è stata rilevata mediante immunofluorescenza come descritto in Grossi et al 1991 (19).

Sono stati rilevati, sia il numero assoluto delle cellule nella piastra, diretta indicazione dell'azione citotossica dei vari composti utilizzati (espresso come percentuale rispetto al campione non trattato) (colonna 5), che il numero di cellule che mantenevano il potenziale proliferativo (inteso come cellule in grado di sintetizzare il proprio DNA) (colonna 4), e che quindi non erano sopravvissute all'effetto tossico dei farmaci somministrati. In tal senso è stato sempre considerato il controllo in parallelo.

Osservando il numero di cellule sopravvissute, ed il numero di quelle che si sono rivelate anche in grado di rientrare in ciclo, si è avuta innanzitutto una conferma dei risultati dell'esperimento esposti nell'esempio 7 relativamente alla 2ClAd. Pur osservandosi una percentuale elevata di cellule rimaste adese (97), tra di esse il numero di quelle che effettivamente ha mantenuto il potenziale proliferativo è molto bassa (solo il 3%); in tal senso la sintesi del DNA si è mostrata inibita in modo pressoché totale a dispetto della osservazione relativa alla sola presenza delle cellule.

Per quanto riguarda gli altri farmaci candidati (3FT, Ara C, 6ThG) essi si dimostrano non tossici rispetto alle cellule arrestate in fase intermitotica, mentre la doxorubicina, che pure era considerato in arte un potenziale farmaco da utilizzare nella eradicazione di cellule tumorali si dimostra eccessivamente tossico nei confronti delle cellule normali. In conseguenza mentre 3FT, Ara C, 6ThG hanno mostrato la appartenenza alla classe B di farmaci come definita, sia la 2ClAd che la doxorubicina ne sono rimaste escluse.

In tal senso, dato che la classe B è una classe aperta tale esperimento si pone come controprova per la verifica della sussistenza del requisito della assenza

di tossicità in capo a composti candidati per la inclusione nella classe B di farmaci.

Esempio 9: verifica della tossicità dei farmaci di classe B in seguito ad elevazione delle concentrazioni di farmaco utilizzate.

Al fine di verificare se ed in che misura era possibile procedere ad una variazione delle concentrazioni dei composti di classe B utilizzate nella serie precedente di esperimenti (che sono quelle minime per ottenere un effetto citotossico sulle cellule tumorali in proliferazione) in particolare modo aumentandole per potenziare l'efficacia di eradicazione nell'unità di tempo, è stata condotta una serie di esperimenti in cui si è verificato l'effetto dell'aumento di concentrazione dei composti che si sono dimostrati composti di classe B. I risultati sono schematizzati nella seguente tabella 9.

TABELLA 9

	Farmaci	# nuclei	BrdU ⁺	% in fase S	% cellule
1	0	216	96	44	100
2	2ClAd (80 μ M)	208	1	1	83
3	DOXO (1 μ g/ml)	28	0	0	8
4	Citidina 50 μ M	240	110	46	102
5	Citidina 100 μ M	204	97	48	99
6	Citidina 200 μ M	220	97	44	101
7	Citidina 400 μ M	248	106	43	90
8	Citidina 800 μ M	212	70	33	96
9	AraC (50 μ M)	260	121	47	67
10	AraC (100 μ M)	224	89	40	81
11	AraC (200 μ M)	228	67	29	80
12	AraC (400 μ M)	240	43	18	84
13	AraC (800 μ M)	244	28	11	79
14	Timidina (50 μ M)	221	92	42	100
15	Timidina (100 μ M)	221	90	41	93
16	Timidina (200 μ M)	210	79	38	92
17	Timidina (400 μ M)	224	94	42	87
18	Timidina (800 μ M)	244	100	41	84
19	3FT (50 μ M)	241	106	44	81

TABELLA 9 (CONTINUA)

20	3FT (100 μ M)	260	108	42	73
21	3FT (200 μ M)	240	85	36	79
22	3FT (400 μ M)	252	107	42	68
23	3FT (800 μ M)	240	120	50	51

La colonna 1 mostra i differenti farmaci utilizzati nei vari saggi (3FT; Ara. C; 2ClAd; Doxo;) i nucleotidi controllo (citidina e timidina) con le relative concentrazioni; La colonna 2 mostra il numero totale dei nuclei osservati;

La colonna 3 mostra il numero dei nuclei che hanno incorporato BrdU in esito al trattamento con i vari farmaci;

La colonna 4 mostra la percentuale di cellule che hanno effettuato sintesi di DNA esito al trattamento i vari farmaci, estrapolato sulla base dei dati riportati nelle colonne 2 e 3;

La colonna 5 mostra la percentuale di cellule che sono rimaste adese alla fine del trattamento (percentuale rispetto al controllo non trattato).

La riga 1 mostra l'esito del saggio condotto somministrando vettore H2O ;

La riga 2 mostra l'esito del saggio condotto somministrando 2ClAd 80 μ M;

La riga 3 mostra l'esito del saggio condotto somministrando Doxo 1 μ g/ml;

Le righe 4-8 mostrano l'esito dei saggi condotti somministrando citidina a concentrazioni 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M e 800 μ M rispettivamente;

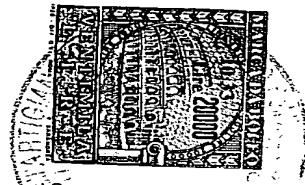
Le righe 9-13 mostrano l'esito dei saggi condotti somministrando Ara C a concentrazioni 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M e 800 μ M rispettivamente;

Le righe 14-18 mostrano l'esito dei saggi condotti somministrando timidina a concentrazioni 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M e 800 μ M rispettivamente;

Le righe 19-23 mostrano l'esito dei saggi condotti somministrando 3FT a concentrazioni 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M e 800 μ M rispettivamente.

Le condizioni di coltura e sperimentalni sono le stesse di quelle descritte nell'esempio 8, con la eccezione del trattamento farmacologico che nella presente serie di saggi viene effettuato:

- per i saggi riportati nelle righe 9-13, nella somministrazione per 48 ore di Ara C alle concentrazioni 50 μ M (riga 9), 100 μ M (riga 10), 200 μ M (riga 11), 400 μ M (riga 12) e 800 μ M (riga 13) rispettivamente;
- per i saggi di controllo per l'Ara C riportati nelle righe 4-8, nella somministrazione per 48 ore di citidina alle concentrazioni 50 μ M (riga 4), 100 μ M (riga 5), 200 μ M (riga 6), 400 μ M (riga 7) e 800 μ M (riga 8) rispettivamente;



- per i saggi riportati nelle righe 19-23, nella somministrazione per 48 ore di 3FT alle concentrazioni 50 μM (riga 19), 100 μM (riga 20), 200 μM (riga 21), 400 μM (riga 22) e 800 μM (riga 23) rispettivamente;
- per i saggi di controllo per la 3FT riportati nelle righe 14-18, nella somministrazione per 48 ore di timidina alle concentrazioni 50 μM (riga 14), 100 μM (riga 15), 200 μM (riga 16), 400 μM (riga 17) e 800 μM (riga 18) rispettivamente;
- per il saggio di controllo riportato nella riga 1 nella somministrazione di BrdU per 48 ore;
- per il saggio di controllo riportato nella riga 2 nella somministrazione di 2ClAd 80 μM , per 48 ore;
- per il saggio di controllo riportato nella riga 3 nella somministrazione di Doxorubicina (Doxo) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, per 48 ore;

La doxorubicina e la 2ClAd, esclusi dalla classe B in seguito alla serie di saggi riportati nell'esempio 7, sono stati qui usati come controlli.

La necessità di aggiungere come ulteriori controlli specifici, i saggi condotti con citidina per l'Ara C e timidina per la 3FT, è stata dettata dalla necessità di evitare la distorsione del dato conseguente secondo alcuni autori in letteratura all'aumento di tossicità conseguente all'utilizzo di alte concentrazioni di nucleosidi.

L'esperimento specifico è consistito in particolare nell'aumentare di circa 10 volte la concentrazione di farmaco di classe B somministrata rispetto alla dose minima per la eradicazione delle cellule nell'uso combinato con i farmaci di classe A. Il fine ultimo è quello di verificare se è possibile migliorare la efficacia della eradicazione (soprattutto riferendosi al

trattamento in vivo o ex vivo) aumentando le concentrazioni di chemioterapico, superando la limitazione nel dosaggio dovuta alla sua tossicità.

Il risultato dimostra che mentre la trifluorotimidina inizia ad essere tossica a 400-800 μM , dato che la percentuale di cellule che entrano in fase S è inalterata rispetto agli altri saggi ma il numero di cellule osservate diventa pressappoco la metà (vedi righe 22-23), l'Ara C inizia ad essere tossica tra 200 e 400 μM , dato che in questo caso il numero di cellule osservate rimane uguale, ma la percentuale di cellule capaci di entrare in S diminuisce, (vedi righe 11-12).

Da tali risultati, anche e soprattutto in quanto comparati con quelli relativi ai due composti controllo 2ClAd e Doxorubicina che danno una crescita 0, è possibile affermare che in seguito all'uso combinato di farmaci di classe A e di classe B è possibile aumentare fino a 10 volte la concentrazione di farmaco di classe B in quanto pur essendoci una certa tossicità essa è comunque trascurabile. Per quanto riguarda i dosaggi ottimali la 3FT sembra essere ben tollerata sino a concentrazioni 400/800 μM . L'AraC invece già a concentrazioni 400 μM sembra inibire la sintesi di DNA.

Esempio 10: estensione dell'applicabilità del metodo a linee cellulari tumorali e normali umane

Il sistema in cui sono stati condotti tutti i saggi per la sperimentazione dell'uso combinato di farmaci di classe A e classe B e per la definizione stessa di classe A e classe B di farmaci, è stato costruito al fine di riprodurre il più fedelmente possibile la situazione patologica in vivo nell'uomo. Al fine di ottenere una conferma della piena applicabilità dei risultati ottenuti sul

sistema delle cellule C3H a cellule umane, sono stati condotti i saggi i cui risultati sono riassunti nelle seguenti tabelle 10 A e 10 B.

TABELLA 10A

			% 1N	% 2N	% 3/4N	% >4N
1	-----	Lipari	97	2	0	0
2	-----	T97	60	18	20	2
3	-----	U973	71	14	14	1
4	Citocalasina D (400nM)	Lipari	19	30	33	18
5	Citotocalasina D (400nM)	T97	13	18	38	31
6	Citocalasina D (400nM)	U973	8	40	40	12
7	Latrunculina B (650nM)	Lipari	32	34	24	10
8	Latrunculina B (650nM)	T97	16	30	37	17
9	Latrunculina B (650nM)	U973	21	35	32	11
10	Jasplakinolide (700nM)	Lipari	38	28	21	13
11	Jasplakinolide (700nM)	T97	17	19	41	23
12	Jasplakinolide (700nM)	U973	6	60	25	9
13	Condramide B (100nM)	Lipari	21	35	33	11
14	Condramide B (100nM)	T97	*	*	*	*
15	Condramide B (100nM)	U973	*	*	*	*

La colonna 1 mostra i composti di classe A somministrati (Latrunculina, Jasplakinolide e Condramide) e le relative concentrazioni;

La colonna 2 mostra i tipi cellulari piastrati (Lipari; T97; U973);

Le colonne 3, 4, 5 e 6 indicano la percentuale di cellule che alla fine del trattamento si mostrano mononucleate (colonna3), binucleate (colonna 4), tri/tetranucleate (colonna 5) o con un numero di nuclei superiore a 4 (colonna 6);

Le righe 1-3 mostrano l'esito dei saggi di controllo (trattamento con il solo vettore DMSO 0,11%) su cellule Lipari (riga 1), T97 (riga 2) e U973 (riga 3);

Le righe 4 -6 mostrano l'esito della somministrazione di citocalasina D 400 nM dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48, su cellule Lipari (riga 4), T97 (riga 5) e U973 (riga 6);

Le righe 7 -9 mostrano l'esito della somministrazione di latrunculina B 650 nM dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48, su cellule Lipari (riga 7), T97 (riga 8) e U973 (riga 9);

Le righe 10 -12 mostrano l'esito della somministrazione di jasplakinolide 700 nM dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48, su cellule Lipari (riga 10), T97 (riga 11) e U973 (riga 12);

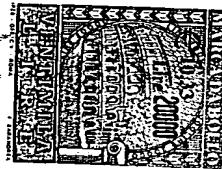
Le righe 13 -15 mostrano l'esito della somministrazione di condramide B 100 nM dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48, su cellule Lipari (riga 13), T97 (riga 14) e U973 (riga 15);

* altissima percentuale di cellule apoptotiche.

Le condizioni di coltura e di reazione sono identiche a quelle riportate nell'esempio 9, tabella 9, con la eccezione del fatto che le cellule utilizzate

sono i glioblastomi Lipari, T97 ed U973, e che i dati riguardanti lo stato di nucleazione sono stati osservati in seguito a somministrazione di:

- per i saggi di cui alle righe 4-6 (effettuati su cellule Lipari (riga 4), T97 (riga 5) e U973 (riga 6)) citocalasina D 400 nM per un periodo di 48 ore (T0-T48), laddove nelle ultime 24 ore di trattamento (T24-48) è stata aggiunta anche la BrdU per controllare la percentuale di cellule capaci di entrare in fase S;
- per i saggi di cui alle righe 7-9 (effettuati su cellule Lipari (riga 7), T97 (riga 8) e U973 (riga 9)) latrunculina 650 nM per un periodo di 48 ore (T0-T48), laddove nelle ultime 24 ore di trattamento (T24-48) è stata aggiunta anche la BrdU per controllare la percentuale di cellule capaci di entrare in fase S;
- per i saggi di cui alle righe 10-12 (effettuati su cellule Lipari (riga 10), T97 (riga 11) e U973 (riga 12)) jasplakinolide 700 nM per un periodo di 48 ore (T0-T48), laddove nelle ultime 24 ore di trattamento (T24-48) è stata aggiunta anche la BrdU per controllare la percentuale di cellule capaci di entrare in fase S;
- per i saggi di cui alle righe 13-15 (effettuati su cellule Lipari (riga 13), T97 (riga 14) e U973 (riga 15)) condramide 100 nM per un periodo di 48 ore (T0-T48), laddove nelle ultime 24 ore di trattamento (T24-48) è stata aggiunta anche la BrdU per controllare la percentuale di cellule capaci di entrare in fase S;
- per i saggi di controllo di cui alle righe 1-3 (effettuati su cellule Lipari (riga 1), T97 (riga 2) e U973 (riga 3)) BdRU per un periodo di 48 ore per controllare la percentuale di cellule capaci di entrare in fase S;



Dall'analisi dei risultati si evidenzia che al pari delle cellule C3H10T1/2v-src/v-myc anche le cellule dei glioblastomi umani multinucleano in seguito a trattamento con composti di classe A (vedi risultati relativi alla percentuale di cellule tri-tetra nucleate o con numero di nuclei superiore a 4 riportati in colonne 5 e 6 rispettivamente). In particolare la condramide dimostra un'azione ancora più efficace quando esportata sulle cellule umane dato che, non solo determina la multinucleazione delle cellule tumorali ma si rivela addirittura in grado di ucciderle dimostrando di essere in grado di cooperare con il farmaco di classe B. In questo senso il suo uso nel metodo costituisce una forma di realizzazione preferita.

Al fine di ottenere conferma anche per quanto riguarda gli effetti sulle cellule normali lo stesso schema sperimentale è stato quindi ripetuto su fibroblasti umani derivanti dal derma e dal polmone, che sono cellule primarie. I risultati per la sola citocalasina D sono riportati nella seguente tabella 10 B

TABELLA 10B

		% 1N	% 2N	% 3/4N	% >4N
1	Fibroblasti (polmone)	91	6	3	0
2	Citocalasina D 400 nM	31	64	5	0
3	Fibroblasti (derma)	96	2	2	0
4	Citocalasina D 400 nM	41	57	2	0

La colonna 1 mostra il composto di classe A somministrato (citocalasina D) e le relative concentrazioni;

La colonna 2 mostra i tipi cellulari piastrati (Fibroblasti umani derivanti da polmone o derma);

Le colonne 3, 4, 5 e 6 indicano la percentuale di cellule che alla fine del trattamento si mostrano mononucleate (colonna 3), binucleate (colonna 4), tri/tetranucleate (colonna 5) o con un numero di nuclei superiore a 4 (colonna 6);

Le righe 1 e 3 mostrano l'esito dei saggi di controllo sui fibroblasti di polmone (riga 1), e sui fibroblasti del derma (riga 3);

Le righe 2 e 4 mostrano l'esito della somministrazione di citocalasina D 400 nM dal tempo T0 al tempo T48 e di BrdU dal tempo T24 al tempo T48, su fibroblasti di polmone (riga 2), e su fibroblasti del derma (riga 4).

In esito a tali esperimenti si osserva che anche per le cellule umane la azione dei farmaci di classe A determina la binucleazione delle cellule e l'arresto della replicazione del DNA e dell'ingresso in fase S delle cellule normali. Anche se il dato non è mostrato, anche per le cellule umane l'azione si è dimostrata pienamente reversibile.

In tal senso l'esito di questi saggi conferma la applicabilità dell'uso combinato di cui alla presente invenzione anche al sistema umano e la piena estensibilità al sistema umano dei risultati ottenuti sul sistema modello, di cui questi esperimenti costituiscono in conseguenza peraltro una validazione.

Esempio 11: verifica della riferibilità della determinazione dello status di binucleazione/multinucleazione alla perdita della funzione di uno o più "Tumor Suppressor Gene".

Al fine di analizzare il campo di applicazione dell'uso combinato di cui alla presente invenzione, in parallelo agli esperimenti condotti sul sistema modello, sono stati effettuati esperimenti allo scopo di verificare il meccanismo molecolare sottostante alla determinazione dello status di binucleazione/multinucleazione nelle cellule normali/tumorali rispettivamente. Le cellule utilizzate in particolare sono state quelle derivate da topi knock-out per le funzioni associate ai geni Rb (retinoblastoma), p21 e p53. In particolare sono state utilizzate cellule knock-out per la sola funzione Rb, per la sola funzione p21 o per la sola funzione p53, in coltura. In ciascun tipo di cellule la relativa funzione knock-out non esiste, per cui il dato ottenuto su ciascuno di essi può essere automaticamente riferito alla perdita della relativa funzione.

TABELLA 11A

	%1N	%2N	%3-4N	%>4N
1 MEF(Rb-/-)	12,2	84,4	1,8	0,4
2 MEF(p21-/-)	16,2	80,4	3,1	1
3 MEF	30,7	67,5	0,8	0,8
4 MDF	24,3	74,7	1,4	0,4

In colonna 1 sono descritti i tipi cellulari utilizzati

Nelle colonne 2-5 sono indicate in percentuale le classi di nucleazione.

Riga 1: cellule con la funzione del gene p21 mutata

Riga 2: cellule con la funzione del gene Rb mutata

Riga 3: fibroblasti embrionali di controllo.

Riga 4: fibroblasti del derma

Tutte le cellule sono state trattate con CD (400nM) per un periodo di 72h.

TABELLA 11B

		%1N	%2N	%3-4N	%>4N
1	BalbC(10/1)				
2	32°C	2,1	23,2	53,4	21,1
3	37°C	1,4	21,7	46,2	30,8
4	BalbC(10/1)-p53Val5				
5	32°C	37,9	60,6	1,5	0
6	37°C	2,9	33,8	38,2	25

In colonna 1 sono descritti i tipi cellulari utilizzati e le temperature alle quali le cellule sono state tenute.

Nelle colonne 2-5 sono indicate in percentuale le classi di nucleazione.

Riga 1: viene riportato il tipo cellulare utilizzato (p53 -/-)

Riga 2 cellule con funzione inattivata coltivate a 32°C (controllo della riga 6)

Riga 3 cellule con funzione inattivata coltivate a 37°C

Riga 4: viene riportato il tipo cellulare utilizzato (p53 +/+)

Riga 5 cellule in cui è stata ripristinata la funzione p53 (temperatura permissiva)

Riga 6 cellule in cui il gene p53 reimmesso non è funzionale (temp. restrittiva – controllo della riga 6)

Tutte le cellule sono state trattate con CD (400nM) per un periodo di 72h.

Le cellule sono state cresciute in condizioni standard, lo schema sperimentale ricalca quello dell'esempio 1. La dilatazione dei tempi di trattamento da 24 a 72 ore è dovuta al fatto che queste cellule primarie hanno un ciclo cellulare più lungo delle C3H10T1/2 e quindi si è reso necessario escludere ogni possibile dubbio relativo alle forme binucleate trovate in seguito a trattamento con CD. Nella parte A della tabella è stato eseguito lo stesso esperimento fatto in tabella 9A per validare il sistema su cellule derivate da topi knock-out per

Rb (riga 1) p21 (riga 2) nonché anche su cellule MEF e MDF (righe 3 e 4) che sono delle cellule primarie di topo usate come controlli.

In tal senso si osserva che sia le cellule Rb- che le cellule p21- al pari dei controlli MEF che MDF rimangono allo stato di binucleate (vedi lane 1 e 2), provando che l'assenza delle funzioni Rb e p21 non è determinante per la multinucleazione di cellule tumorali conseguente alla somministrazione di citocalasina D o analoghi.

Ciò implica che i geni Rb e p21 che pure sono implicati nella endoreduplicazione del DNA, non sono implicati nella multinucleazione conseguente alla somministrazione degli inibitori del fuso, e quindi della citodieresi.

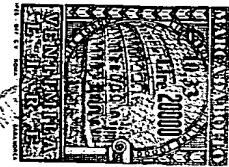
Nella parte B della tabella è riportato invece il dato riferito allo stesso esperimento condotto su cellule Balb/c(10)1.

Queste cellule derivano da topi knock-out per la funzione p53. In esse è stato reintrodotto un mutante *ts* (temperatura sensibile) di p53, tale che a 37° dà luogo ad una proteina p53 inattiva (con assenza della relativa funzione), a 32° dà luogo ad una proteina p53 attiva (con presenza della relativa funzione).

I risultati riportati in tabella mostrano che quando la funzione p53 è assente, le cellule multinucleano (vedi riga 3), quando la funzione è restaurata (a 32°) non multinucleano (vedi riga 2).

Esempio 12: verifica della estensione del dato relativo a p53 al sistema umano

Al fine di ottenere una conferma del dato ottenuto nell'esempio 11 (ruolo fondamentale della funzione di p53 nel controllo della multinucleazione) sono stati condotti esperimenti utilizzando gli stessi fibroblasti umani di



polmone, utilizzati prima nell'esperimento descritto nell'esempio 10 (LHF), trasfettati con 2 oncogeni del papilloma virus (E6 ed E7). E6 è un oncogene il cui prodotto è in grado di sequestrare ed inibire la funzione di p53, E7 invece è un gene il cui prodotto è in grado di sequestrare e inibire la funzione di Rb.

I risultati sono esposti nella seguente tabella 12.

TABELLA 12

		%1N	%2N	%3-4N	%>4N
1	DMSO	HF LXSН	96	2	2
2	CD	HF LXSН	59	40	1
3	DMSO	HF E6	92	5	3
4	CD	HF E6	15	38	31
5	DMSO	HF E7	89	7	4
6	CD	HF E7	57	40	4

In colonna 1 è indicato il trattamento farmacologico

In colonna 2 sono descritti i tipi cellulari utilizzati

Nelle colonne 3-5 sono indicate in percentuale le classi di nucleazione.

Riga 1: fibroblasti umani di controllo infettati con il vettore retrovirale vuoto trattati con DMSO (0,11%)

Riga 2: fibroblasti umani di controllo infettati con il vettore retrovirale vuoto trattati con citocalasina D (400nM).

Riga 3: fibroblasti umani di controllo infettati con il vettore retrovirale esprimente l'oncogene E6 trattati con DMSO (0,11%)

Riga 4: fibroblasti umani di controllo infettati con il vettore retrovirale esprimente l'oncogene E6 trattati con citocalasina D (400nM)

Riga 5: fibroblasti umani di controllo infettati con il vettore retrovirale esprimente l'oncogene E7 trattati con DMSO (0,11%)

Riga 6: fibroblasti umani di controllo infettati con il vettore retrovirale esprimente l'oncogene E7 trattati con citocalasina D (400nM).

Questo esperimento costituisce sul sistema umano un ulteriore controllo della funzione di p53 sul blocco della multinucleazione in cellule normali e della non implicazione di Rb in questo fenomeno.

Le condizioni di coltura e lo schema sperimentale seguito sono quelli descritti nell'esempio 11.

Infatti i fibroblasti trasformati con E6 in presenza di citocalasina multinucleano (vedi riga 4), i fibroblasti trasformati con E7 in presenza di

citocalasina non multinucleano (vedi riga 6). Questo conferma il dato ricavato su topi.

GLOSSARIO

Con il termine "cellule tumorali" come qui utilizzato ci si riferisce:

- in vivo a cellule che compongono le varie forme tumorali;
- in vitro a cellule o trasformate in vitro (diventate cioè tumorigeniche sia spontaneamente sia tramite l'espressione di oncogeni) o derivanti da espianti tumorali, comunque non rispondenti ai requisiti indicati nei punti 1-3 della definizione di cellule normali in vitro.

Con il termine "cellule normali" come qui utilizzato ci si riferisce:

- in vivo a tutte le cellule dell'organismo che non si trovino in uno stato trasformato o tumorale;
- in vitro a cellule primarie o stabilizzate in coltura, che abbiano mantenuto quelle caratteristiche identificate come normali allo stato della tecnica cioè:
 1. dipendenza per la proliferazione dai fattori di crescita;
 2. incapacità di formare tumori se iniettate in topi immunodeficienti;
 3. incapacità di formare foci di trasformazione negli appositi saggi; e
 4. dipendenza per la crescita dall'ancoraggio (per quelle che normalmente crescono adese).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. De vita VT, Helman S, Rosenberg SA - CANCER 5th edition; Lippincott-Raven.
2. Grzegorzewski K, Ruscetti FW, Usui N, Damia G, Longo DL, Carlino JA, Keller JR, Wiltzout RH - Recombinant transforming growth factor

beta 1 and beta 2 protect mice from acutely lethal doses of 5-fluorouracil and doxorubicin. *J Exp Med* 1994 Sep 1;180(3):1047-57

3. Sonis ST, Lindquist L, Van Vugt A, Stewart AA, Stam K, Qu GY, Iwata KK, Haley JD - Prevention of chemotherapy-induced ulcerative mucositis by transforming growth factor beta 3. *Cancer Res* 1994 Mar 1;54(5):1135-8
4. Gardner RV - Interferon-gamma (IFN-gamma) as a potential radio- and chemo-protectant. *Am J Hematol* 1998 Jul;58(3):218-23
5. Natori S - Toxic cytochalasins. *Mycotoxins* 1978 May 24 pp. 559-81
Kunze B, Jansen R,
6. Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Graweiss A - Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 1983 Feb 4;219(4584):493-5
7. Scott VR, Boehme R, Matthews TR- New class of antifungal agents: jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1988 Aug;32(8):1154-7
8. Sasse F, Hofle G, Reichenbach H - Chondramides A approximately D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot (Tokyo)* 1995 Nov;48(11):1262-6
9. Bray D - Cytochalasin action *Nature* 1979 Dec 13;282(5740):671
10. Smith GF, Ridler MA, Faunch JA - Action of cytochalasin B on cultured human lymphocytes. *Nature* 1967 Dec 16;216(120):1134-5
11. Kelly F, Sambrook J - Differential effect of cytochalasin B on normal and transformed mouse cells. *Nat New Biol* 1973 Apr 18;242(120):217-9



12. O'Neill FJ, Miller TH, Hoen J, Stradley B, Devlahovich V - Differential response to cytochalasin B among cells transformed by DNA and RNA tumor viruses. *J Natl Cancer Inst* 1975 Oct;55(4):951-5
13. O'Neill FJ - Selective destruction of cultured tumor cells with uncontrolled nuclear division by cytochalasin B and cytosine arabinoside. *Cancer Res* 1975 Nov;35(11 Pt 1):3111-5
14. Plagemann PG, Estensen RD - Cytochalasin B. VI. Competitive inhibition of nucleoside transport by cultured Novikoff rat hepatoma cells. *J Cell Biol* 1972 Oct;55(1):179-85
15. Zylka JM, Plagemann PG - Purine and pyrimidine transport by cultured Novikoff cells. Specificities and mechanism of transport and relationship to phosphoribosylation. *J Biol Chem* 1975 Aug 10;250(15):5756-67
16. Tanaka K, Kuwano M, Endo H - Effect of cytochalasin-B on the transport of 5-fluorouracil in cultured mammalian cells. *Gann* 1975 Jun;66(3):331-4
17. Prives C, Hall PA - The p53 pathway. *J Pathol* 1999 Jan; 187(1): 112-26.
18. McClatchey AI, Jacks T - Tumor suppressor mutations in mice: the next generation. *Curr Opin Genet Dev* 1998 Jun;8(3):304-10
19. Grossi M, Calconi A, Tatò F - v-jun oncogene prevents terminal differentiation and suppresses muscle-specific gene expression in ASV-17-infected muscle cells. *Oncogene* 1991 Oct;(10): 1767-73
20. Bignami M, Rosa S, La Rocca SA, Falcone G, Tato F - Differential influence of adjacent normal cells on the proliferation of mammalian cells transformed by the viral oncogenes myc, ras and src. *Oncogene* 1988 May;2(5):509-14

Alessandro Steinfl
(Iscr. Albo n. 831 B)

A. Steinfl



R M 99 A 000580

RIVENDICAZIONI

1. Metodo di eradicazione di cellule tumorali con funzione p53 inattiva, da una coltura *in vitro* comprendente dette cellule tumorali con funzione p53 inattiva e cellule normali aventi capacità proliferativa, comprendente le seguenti operazioni in successione:

a. somministrare a dette cellule tumorali con funzione p53 inattiva ed a dette cellule normali aventi capacità proliferativa un composto di classe A,

detta classe A essendo costituita da composti aventi le seguenti proprietà:

- capacità di inibire la citodieresi di cellule normali;
- capacità di avere un'azione reversibile almeno sulle cellule normali;
- capacità di mostrare una percentuale di inibizione minore o uguale al 50% dei meccanismi di trasporto di composti di classe B,

detta classe B essendo costituita da composti aventi le seguenti proprietà:

- capacità di avere una azione citotossica nei confronti delle cellule attivamente proliferanti;
- capacità di non alterare sostanzialmente la vitalità cellulare, il potenziale proliferativo e/o la fisiologia specifica di cellule in fase intermitotica;

ottenendo in seguito alla somministrazione di detto composto di classe A l'arresto in fase intermitotica di almeno una parte di dette cellule normali aenti capacità proliferativa;

b. mantenendo detta somministrazione del composto di classe A ed in seguito a detto arresto in fase intermitotica di almeno una parte di dette

cellule normali aenti capacità proliferativa, somministrare un composto di classe B, ottenendo eradicazione selettiva di dette cellule tumorali aenti funzione p53 inattiva;

c. interrompere la somministrazione di detto composto di classe A e di detto composto di classe B permettendo la proliferazione in coltura di dette cellule normali aenti capacità proliferativa.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la operazione c. comprende in successione le operazioni di:

c1. interrompere la somministrazione del solo composto di classe B e fare spurgare il composto di classe B dalla coltura;

c2. interrompere la somministrazione del composto di classe A e permettere la proliferazione in coltura delle cellule normali aenti capacità proliferativa.

3. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti caratterizzato dal fatto che la durata della operazione a. è maggiore o uguale alla durata del ciclo cellulare di dette cellule normali aenti capacità proliferativa.

4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti caratterizzato dal fatto che la durata della operazione b. è maggiore o uguale alla durata del ciclo cellulare di dette cellule tumorali con funzione inattivata.

5. Metodo secondo la rivendicazione 2 oppure dalla rivendicazioni 3 oppure 4 quando dipendenti dalla rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che la durata della operazione c1. è maggiore o uguale a 3 ore.

6. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti caratterizzato dal fatto che la successione di operazioni da a. a c. viene ripetuta in detta coltura in vitro.

7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti caratterizzato dal fatto che detto composto di classe A è scelto dal gruppo comprendente le citocalasine con la esclusione della citocalasina B, le jasplakinolidi, le condramidi e le latrunculine.

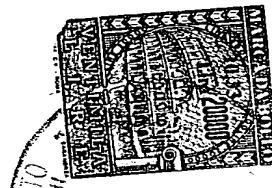
8. Metodo secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe A è scelto dal gruppo comprendente la citocalasina D, la jasplakinolide, la condramide B e la latrunculina B.

9. Metodo secondo la rivendicazione 7 oppure 8, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe A ha una concentrazione compresa nell'intervallo tra 1 nM e 4 μ M.

10. Metodo secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe A è citocalasina D, avente una concentrazione compresa nell'intervallo tra 20 nM e 2 μ M.

11. Metodo secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe A è jasplakinolide, avente una concentrazione compresa nell'intervallo tra 50 nM e 3 μ M.

12. Metodo secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe A è latrunculina, avente una concentrazione compresa nell'intervallo tra 500nM e 2 μ M.



13. Metodo secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe A è condramide B, avente una concentrazione compresa nell'intervallo tra 10 nM e 800nM.

14. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe B è scelto dal gruppo comprendente ~~trifluorotimidina, citarabina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, gemcitabina, fludarabina, floxuridina, ftorafur, metotrexato, trimetrexato, raltitrexed, edatrexato, lometrexol, idrossiurea, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel e 10-deacetil-baccatin III, irinotecan, topotecan, 9-amino-S(20)-camptothecina.~~

15. Metodo secondo la rivendicazione 14, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe B ha una concentrazione maggiore o uguale a 100nM.

16. Metodo secondo la rivendicazione 15, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe B ha una concentrazione compresa nell'intervallo tra 100nM e 800 μ M

17. Metodo secondo la rivendicazione 15, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe B è trifluorotimidina, avente una concentrazione maggiore o uguale a 40 μ M.

18. Metodo secondo la rivendicazione 17, caratterizzato dal fatto che detta trifluorotimidina ha una concentrazione compresa nell'intervallo da 40 μ M a 800 μ M.

19. Metodo secondo la rivendicazione 18, caratterizzato dal fatto che detta trifluorotimidina ha una concentrazione 50 μ M

20. Metodo secondo la rivendicazione 16, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe B è citarabina, avente una concentrazione maggiore o uguale a 40 μ M.

21. Metodo secondo la rivendicazione 20, caratterizzato dal fatto che detta citarabina ha una concentrazione compresa nell'intervallo da 40 μ M a 600 μ M.

22. Metodo secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che detta citarabina ha una concentrazione di 40 μ M

23. Metodo secondo la rivendicazione 16, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe B è 6-tioguanina, avente una concentrazione maggiore o uguale a 50 μ M.

24. Metodo secondo la rivendicazione 23, caratterizzato dal fatto che detta 6-tioguanina ha una concentrazione compresa una concentrazione compresa nell'intervallo da 50 μ M a 600 μ M.

25. Metodo secondo la rivendicazione 24, caratterizzato dal fatto che la 6-tioguanina ha una concentrazione 100 μ M

26. Uso di un composto di classe A in combinazione con un composto di classe B, per eradicare cellule tumorali con funzione p53 inattiva da una coltura in vitro comprendente dette cellule tumorali con funzione p53 inattiva e cellule normali.

27. Uso secondo la rivendicazione 26, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe A è scelto dal gruppo comprendente le citocalasine con la esclusione della citocalasina B, le jasplakinolidi, le condramidi e le latrunculine.

28. Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe A è scelto dal gruppo comprendente citocalasina D, jasplakinolide, condramide B e latrunculina B.

29. Uso secondo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 26 a 28, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe B è scelto dal gruppo comprendente trifluorotimidina, citarabina, 6-tioguanina e 6-mercaptopurina, gemcitabina, fludarabina, floxuridina, fторофур, metotrexato, trimetrexato, raltitrexed, edatrexato, lometrexol, idrossiurea, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel e 10-deacetil-baccatin III, irinotecan, topotecan, 9-amino-S(20)-camptothecina.

30. Composto di classe A per uso come medicamento.

31. Uso di un composto di classe A per la preparazione di farmaci utilizzabili nella terapia di forme tumorali con funzione p53 inattiva.

32. Uso secondo la rivendicazione 31, caratterizzato dal fatto che detto composto è scelto dal gruppo comprendente le citocalasine con la esclusione della citocalasina B, le jasplakinolidi, le condramidi e le latrunculine.

33. Uso secondo la rivendicazione 32, caratterizzato dal fatto che detto composto è scelto dal gruppo comprendente citocalasina D, jasplakinolide condramide B e latrunculina B.

34. Uso secondo la rivendicazione 33, caratterizzato dal fatto che detto composto è condramide B.

35. Uso di un composto di classe B per la preparazione di farmaci caratterizzati dal fatto di essere utilizzabili nel trattamento di forme tumorali

con funzione inattivata in combinazione con farmaci comprendenti almeno un composto di classe A.

36. Uso secondo la rivendicazione 35, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe B è scelto dal gruppo comprendente trifluorotimidina, citarabina, 6-tioguanina e 6-mercaptopurina, gemcitabina, ~~fludarabina, flexuridina, fторофур, метотрексато, trimетрексато, raltitrexed, edatrexato, lometrexol, idrossiurea, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel e 10-deacetil-baccatin III, irinotecan, topotecan, 9-amino-S(20)-camptothecina.~~

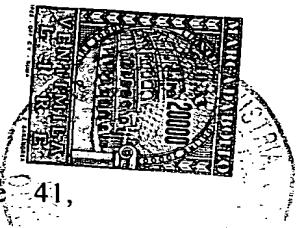
37. Uso secondo la rivendicazione 36, caratterizzato dal fatto che detto composto di classe B è trifluorotimidina.

38. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 35 a 37, caratterizzato dal fatto che dette forme tumorali con funzione inattivata presentano un basso potenziale proliferativo.

39. Composizione farmaceutica comprendente almeno un composto di classe A ed un veicolo farmaceuticamente compatibile caratterizzata dal fatto di essere utilizzabile nel trattamento di forme tumorali con funzione p53 inattiva.

40. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 39, caratterizzata dal fatto che dette forme tumorali presentano un basso potenziale proliferativo.

41. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 39 oppure 40, caratterizzata dal fatto che detto composto di classe A è scelto dal gruppo comprendente le citocalasine con la esclusione della citocalasina B, le jasplakinolidi, le condramidi e le latrunculine.



42. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 41, caratterizzata dal fatto che detto composto di classe A è scelto dal gruppo comprendente citocalasina D, jasplakinolide condramide B e latrunculina B.

43. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 42, caratterizzata dal fatto che detto composto di classe A è condramide B.

44. Composizione farmaceutica comprendente almeno un composto di classe B ed un veicolo farmaceuticamente compatibile, caratterizzata dal fatto di essere utilizzabile in combinazione con almeno una delle composizioni secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 39 a 42 nel trattamento di forme tumorali con funzione inattivata.

45. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 44, caratterizzata dal fatto che detto composto di classe B è scelto dal gruppo comprendente trifluorotimidina, citarabina, 6-tioguanina e 6-mercaptopurina, gemcitabina, fludarabina, floxuridina, fторофур, metotrexato, trimetrexato, raltitrexed, edatrexato, lometrexol, idrossiurea, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel e 10-deacetil-baccatin III, irinotecan, topotecan, 9-amino-S(20)-camptothecina.

46. Kit per la eradicazione di cellule tumorali aventi la funzione p53 inattiva da una coltura di cellule comprendente dette cellule tumorali aventi la funzione p53 inattiva e cellule normali in attiva proliferazione, comprendente:

- i. almeno una composizione comprendente almeno un composto di classe A come definito nella rivendicazione 1;
- ii. almeno una composizione comprendente almeno un composto di classe come definito nella rivendicazione 1;

in cui dette composizioni di cui al punti i. ed ii. sono somministrabili in successione secondo il metodo di cui ad una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 25.

47. Kit secondo la rivendicazione 46 caratterizzato dal fatto che il composto di classe A di cui al punto i. è scelto dal gruppo comprendente le citocalasine con la esclusione della citocalasina B, le jasplakinolidi, le condramidi e le latrunculine.

48. Kit secondo la rivendicazione 47 caratterizzato dal fatto che il composto di classe A è scelto dal gruppo comprendente citocalasina D, jasplakinolide, condramide B e latrunculina B.

49. Kit secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 46 a 58, caratterizzato dal fatto che la composizione di cui al punto ii. comprende un composto di classe B scelto dal gruppo comprendente trifluorotimidina, citarabina, 6-tioguaanina e 6-mercaptopurina, gemcitabina, fludarabina, floxuridina, ftorafur, metotrexato, trimetrexato, raltitrexed, edatrexato, lometrexol, idrossiurea, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel e 10-deacetyl-baccatin III, irinotecan, topotecan, 9-amino-S(20)-camptothecina.

50. Uso delle cellule C3H10T1/2 o di cellule da esse derivate, per la derivazione di metodi per eradicare cellule tumorali con funzione inattivata da colture comprendenti dette cellule tumorali con funzione inattivata e cellule normali.

51. Uso delle cellule C3H10T1/2 o di cellule da esse derivate, per la identificazione di composti di classe A.

52. Uso delle cellule C3H10T1/2 o di cellule da esse derivate, per la identificazione di composti di classe B.

p.p. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"

Alessandro Steinfl
(Iscr. Albo n. 831 B)

Alessandro Steinfl



		T0h	T24h	T72h	T84h	10-15gg
1	Classe A					Ripresa della proliferazione
2	Classe B					„
3	Classe A + Classe B					„

RM99 A 000580

FIG.1

